ISOLIERUNG, STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN DES ANTIBIOTIKUMS HERBICOLIN A

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rudolf Lupp
aus Breslau

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ISOLIERUNG, STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN DES ANTIBIOTIKUMS HERBICOLIN A

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rudolf Lupp
aus Breslau

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 1983

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

MEINER FAMILIE

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Günther Jung in der Zeit vom April 1979 bis Dezember 1983 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G. Jung, danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Abstract

LUPP, RUDOLF

ISOLIERUNG, STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN DES ANTIBIOTIKUMS HERBICOLIN A

Es wurde ein einfaches Reinigungsverfahren für Herbicolin A ausgearbeitet (Adsorptionschromatographie an Servachrom XAD-2, Gelchromatographie an Sephadex LH-20 und Multiplikative Gegenstromverteilung). Dabei mußte die Empfindlichkeit von Herbicolin A gegen acide, basische und nucleophile Reagenzien berücksichtigt werden.
Die Primärstruktur wurde mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie ermittelt. Danach besteht Herbicolin A aus einem Peptidteil mit der Sequenz Deh-Abu-L-Thr-D-a-Thr-D-Leu-Gly-D-Glu-Gly-N-Me-L-a-Thr-L-Arg. Die Carboxygruppe des Arginin bildet mit der Hydroxyfunktion des L-Threonin ein Lacton. N-Terminal ist dieses Peptid durch 3-Hydroxymyristinsäure acyliert, an welche α-glycosidisch Glucose gebunden ist.
Durch Vergleich des CD-Spektrums von Herbicolin A mit den Spektren verschiedener Standards kann angenommen werden, daß im Herbicolin A das selten beobachtete 2_7-Band vorliegt.

Die antifungischen Wirkungsweisen von Herbicolin A und Polyenantibiotika sind sehr ähnlich (Membransteroide müssen vorhanden sein). Die Doppelbindung der Dehydroaminobuttersäure kann katalytisch hydriert werden, ohne daß dadurch die antibiotische Aktivität gegen Pilze verloren geht. Herbicolin A besitzt hämolytische Eigenschaften. Es bildet keine Ionenkanäle aus; an Protoplasten und Chloroplasten sind geringe oder keine Effekte bezüglich einer Permeabilitätsänderung zu erkennen. Bei Paramecien wird durch Zugabe von Herbicolin A eine Steigerung der Guanylatcyclase-Aktivität beobachtet. An B-Lymphocyten konnte kein mitogener Effekt nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen werden diese lysiert.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	BIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON HERBICOLIN A	5
2.1.	Antibiotische Wirkung	5
2.2.	Lytische Eigenschaft von Herbicolin A gegen Humanerythrocyten	9
2.3.	Lytische Wirkung von Herbicolin A auf Protoplasten, isoliert aus Kalluszellen von Daucus carota L.	11
2.4.	Einfluß von Herbicolin A auf die Sauerstoffentwicklung bei Chloroplasten, isoliert aus Radieschenkeimlingen	14
2.5.	Bilayer-Experimente	22
2.6.	Mitogene Stimulation von B-Lymphocyten	22
2.7.	Wirkung von Herbicolin A auf die Aktivität der Guanylatcyclase von Paramecium tetraurelia	24
3.	PROBLEMSTELLUNG	26
4.	GEWINNUNG UND REINIGUNG VON HERBICOLIN A	28
5.	CHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG	32
5.1.	Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie	32

5.2.	Quantitative Aminosäurenanalyse von Herbicolin A durch Ionenaustauschchromatographie	37
5.2.1.	Saure Totalhydrolyse	37
5.2.2.	Alkalische Hydrolyse	37
5.3.	Identifizierung der Dehydroaminosäure	38
5.4.	Identifizierung und Konfigurationsbestimmung der im Herbicolin A enthaltenen Aminosäuren	41
5.5.	Identifizierung und Konfigurationsbestimmung der Hydroxyfettsäure	45
5.6.	Identifizierung des Zuckers im Herbicolin A	47
6.	KERNRESONANZ-SPEKTREN VON HERBICOLIN A	51
6.1.	^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A	51
6.2.	^{13}C-NMR-Spektrum des Dihydro-Herbicolin A	62
6.3.	^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin-A-Methylester	66
6.4.	^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure (Na-salz)	70
6.5.	^{1}H-NMR-Spektrum von Herbicolin A	76
7.	SEQUENZIERUNG	78
7.1.	Strategie der Sequenzierung	78
7.2.	Analytische Trennung von Partialsequenzen nach acidolytischer Spaltung	79
7.3.	Spaltung von Herbicolin A mit Ammoniaklösung	81

7.4.	Sequenzierung von Herbicolin A durch GC/MS	83
8.	DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR VON PEPTIDEN	89
8.1.	Die verschiedenen Konformationen	89
8.2.	Circulardichroismus der verschiedenen Konformationen	97
8.3.	Das CD-Spektrum von Herbicolin A	100
8.4.	Ermittlung der Konformationsanteile im Herbicolin A	115
8.5.	Konformationsvorhersage	117
9.	DERIVATISIERUNG VON HERBICOLIN A	122
9.1.	Katalytische Hydrierung	122
9.2.	Öffnung des Lactonrings zur Herbicolin-A-Säure	122
9.3.	Herbicolin-A-Methylester	124
9.4.	Dihydro-Herbicolin-A-Methylester	125
10.	EXPERIMENTELLER TEIL	126
10.1.	Materialien	126
10.2.	Isolierung von Herbicolin A aus dem Kulturmedium von Erwinia herbicola 111	127
10.2.1.	Adsorptionschromatographie	127
10.2.2.	Gelchromatographie	128
10.2.3.	Multiplikative Gegenstromverteilung	128
10.3.	HPLC zur Reinheitskontrolle von Herbicolin A	129

10.4. Dünnschichtchromatographie 130
10.5. Hämolysetest 132
10.5.1. Einstellung der Erythrocyten-Suspension 132
10.5.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve der Hämolyse 133
10.6. Lyse von Protoplasten 134
10.6.1. Herstellung der Verdünnungsreihe 135
10.6.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven 135
10.7. Entkopplung der Photosynthese bei Chloroplasten 140
10.7.1. Isolierung der Chloroplasten 140
10.7.2. Durchführung der Messung 140
10.8. Aminosäurenanalyse 142
10.9. Katalytische Hydrierung von Herbicolin A 142
10.10. Konfigurationsbestimmung 143
10.11. HPLC-Trennungen 144
10.12. NMR-Spektren 144
10.13. Massenspektren 145
10.14 CD-Spektren 145
10.15. Acidolytische Spaltung 146
10.16. Ammoniakalische Spaltung 146
10.17. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid 147
10.18. Edman-Abbau 148
10.19. Herbicolin-A-säure 149
10.20. Herbicolin-A-methylester 149
10.21. Dihydro-Herbicolin-A-methylester 149

11. ZUSAMMENFASSUNG 150

12. LITERATURVERZEICHNIS 152

1. EINLEITUNG

Seit 1977 ist bekannt, daß auch ein Vertreter der Erwinia-Gruppe (Erwinia herbicola) Antibiotika produziert, welche spezifisch antifungische Eigenschaften besitzen, die durchaus mit therapeutisch eingesetzten Antimykotika zu vergleichen sind. Diese Enterobacteriaceen-Art kommt in den Ausscheidungsprodukten von Amphibien und deshalb auch im Wasser von Tümpeln und Teichen vor. So wurde dieser spezielle Stamm in einem Brunnen des Botanischen Gartens in Tübingen gefunden. In der Literatur wird Erwinia herbicola als phytopathogen und zum Teil humanpathogen beschrieben (1).

Es konnte gezeigt werden, daß der Stamm Erwinia herbicola A 111 zwei Antibiotika produziert; diese werden im Folgenden als Herbicolin A und B bezeichnet. Da unter den Kulturbedingungen (Abschnitt 4.) etwa zehnmal so viel Herbicolin A gebildet wird als Herbicolin B, war es sinnvoll, Strukturuntersuchungen vorrangig an Herbicolin A durchzuführen.

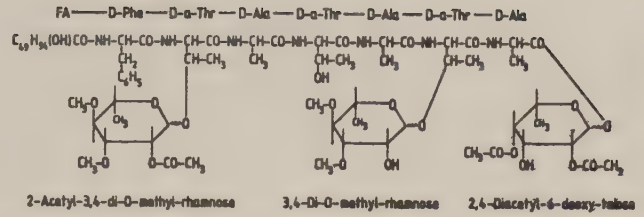
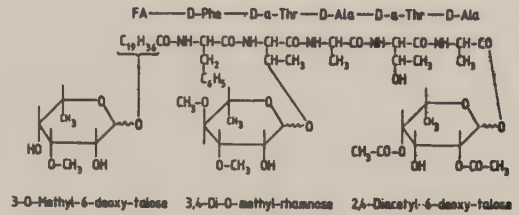
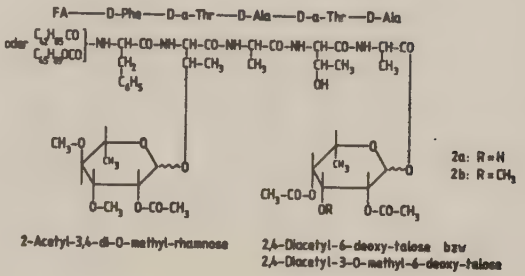
Erste orientierende Aminosäurenanalysen ergaben, daß in Herbicolin A 2 Threonin, 1 Glutaminsäure, 2 Glycin, 1 Leucin und 1 Arginin enthalten sind (oder ein Vielfaches davon). Aufgrund des Verhaltens bei der Gelchromatographie mußte man annehmen, daß das Molekül wesentlich größer als ein Heptapeptid sein muß (2). Nachdem größere Mengen rein zur Verfügung standen, zeigte das ^{13}C-NMR-Spektrum, daß neben diesen 7 Aminosäuren noch eine Fettsäure und ein Zucker im

Herbicolin A enthalten sein müssen. Dieses Spektrum zeigte ferner im Aromatenbereich zwei Signale, die eine Dehydroaminoaminosäure vermuten ließen. Trotz dieser zusätzlichen Informationen konnten nicht alle Kohlenstoff-Signale erklärt werden.

Ein FD-Massenspektrum bestätigte die Annahme, daß Herbicolin A noch eine weitere Komponente enthalten muß. Aufgrund der ^{13}C-NMR-Daten konnte man eine Dihydroxyvaleriansäure oder ein Homologes des Threonin vermuten. Homothreonin erschien jedoch unwahrscheinlich, da dieses bei der Aminosäurenanalyse erkannt worden wäre. Andererseits wurde nach Totalhydrolyse mit Hilfe der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie eine Komponente erhalten, die eher als Homothreonin, jedoch nicht als Dihydroxyvaleriansäure zu interpretieren war, denn im Massenspektrum zeigte diese eine um 14 höhere Masse als Threonin. In Frage kamen deshalb α-Methylthreonin (α-Dialkylaminosäuren lassen sich mit Ninhydrin schlecht anfärben, so daß sie bei der Aminosäurenanalyse leicht übersehen werden) und N-Methyl-threonin. Erst durch vergleichende GC/MS-Untersuchungen (Prof. König, Universität Hamburg) konnte ermittelt werden, daß es sich bei dieser Aminosäure um N-Methyl-L-allo-Threonin handelt.

Nach diesen Ergebnissen ist Herbicolin A als ein Glyco-Lipo-Peptid-Antibiotikum zu bezeichnen. Die einzigen Glyco-

Tab. 1: Bisher bekannte Glyco-Lipo-Peptide: Mycoside

Mycoside C_m		M. avium
Mycoside C_1		M. marianum
Mycoside $C_{2a/b}$		M. marianum

Lipo-Peptide, deren Strukturen aufgeklärt wurden, sind die Mycoside (Tabelle 1). Diese Mycoside sind Stoffwechselprodukte der Mycobacterien, die aber offensichtlich keinerlei antibiotische Wirkung besitzen.

Glyco-Lipo-Peptide, die wie Herbicolin A noch zusätzlich eine Dehydroaminosäure und N-Methyl-aminosäuren enthalten, waren noch nicht bekannt. So konnte deshalb nur teilweise auf die bei den Mycosiden angewandte Strategie zurückgegriffen werden, unter anderem bei der Isolierung des Zuckers.

2. BIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON HERBICOLIN A

2.1. Antibiotische Wirkung

Tab. 2: Antimikrobielle Aktivität von Herbicolin A gegen verschiedene Pilze und Bakterien; Plattendiffusionstest, 10 µg Herbicolin A pro Filterrondelle (6)

Aspergillus fumigatus	+	Bacillus subtilis ATCC 6633	-
Aspergillus melleus	+	Enterobacter cloacae ATCC 13047	-
Botrytis cinerea	+	Escherichia coli ATCC 15922	-
Fusarium dimerum	+	Klebsiella pneumoniae ATCC 27736	-
Neurospora crassa	+	Myoplasma laidlawii	-
Cryptococcus melibiosum	+	Proteus mirabilis	-
Candida albicans	+	Proteus vulgaris ATCC 6380	-
Candida crusei	+	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9721	-
Schizonella melanogramma	+	Staphylococcus aureus ATCC 25923	-
Urocystis occulta	+	Staphylococcus	
Ustilago nuda	+	epidermidis ATCC 14990	-
Trichophyton rubrum	+	Staphylococcus pyrogenes	
Epidermophyton flocossum	+	ATCC 10389	-

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wirkt Herbicolin A ausschließlich gegen Pilze und hefeartige Pilze. Bakterien werden nach bisherigen Beobachtungen dagegen nicht beeinflußt. Andererseits werden auch Algen und Protozoen abgetötet (7).

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentration in µg/ml von Herbicolin A im Reihenverdünnungstest gegen Dermatophyten*; im Vergleich dazu Clotrimazol, welches zur Therapie eingesetzt wird (8).

Stamm	Herbicolin A	Clotrimazol
Trichophyton rubrum	0.2/0.2/0.5	0.1
Trichophyton mentagrophytes	0.4/0.5/0.6	0.1
Microsporum canis	0.5	0.1

Mehrfachansätze sind durch / getrennt.

* Die Dermatophyten stammen aus der Abteilung Dermatologie II der Universitätshautklinik Tübingen. Sie wurden aus klinischem Untersuchungsmaterial isoliert.

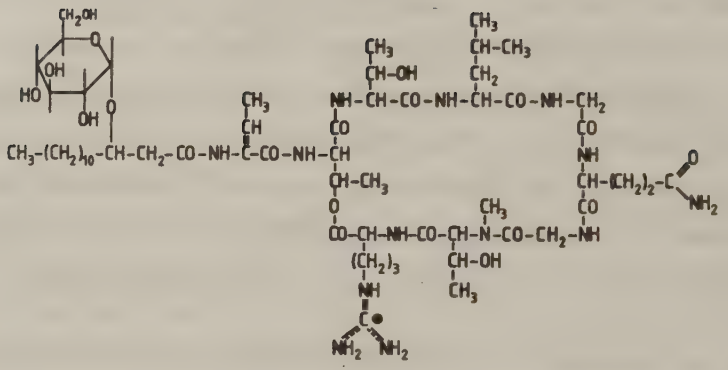
Von klinischem Interesse könnte die hohe antimycetische Wirksamkeit von Herbicolin A gegen Dermatophyten sein (vergleiche Tabelle 3). Herbicolin ist in seiner Wirkung eher mit Polyenantibiotika als mit Imidazolantibiotika zu vergleichen (8,9). Nach RAAB und HÖGL (10) sind die Imidazolantibiotika nicht nur für Permeabilitätsstörungen der Zytoplasmamembran verantwortlich zu machen, sondern vor allem für Veränderungen im Enzymgleichgewicht in der Zelle, so daß unter anderem zu viele Peroxide gebildet werden, die möglicherweise den eigentlichen Zelltod verursachen.

Polyenantibiotika werden in solche Zellmembranen eingebaut, welche Steroide enthalten. Dadurch wird die Membran durchlässig für Wasser und cytoplasmatische Substanzen. Das Ausmaß der Bindung der Polyenantibiotika an die Membran ist proportional der vorhandenen Steroidmenge in der Membran (9). Daher werden Bakterien, die keine Membransteroide besitzen, nicht angegriffen. Polyenantibiotika werden auch in die Membran der Säugetier-Erythrocyten eingelagert und bewirken dort Permeabilitätsstörungen, da die Erythrocytenmembran wie die Zellmembran der Pilze Steroide enthält.

Auch bei Herbicolin A ist gezeigt worden, daß ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Steroiden und antibiotischer Wirksamkeit vorliegt. So konnten FREUNDT und WINKELMANN (11) zeigen, daß Herbicolin A gegen Mycoplasmen wirkt, jedoch nicht gegen Acholeplasmen, wobei erstere Cholesterin, letztere aber keines in ihrer Membran enthalten. Chr. GLÜCK (12) beobachtete, daß eine gleichzeitige Zugabe von Ergosterin zur Antibiotikumlösung beim Plattendiffusionstest eine Hemmung der antifungischen Aktivität zur Folge hat. Diese Hemmung kann als "Komplex-Bildung" von Herbicolin A mit dem Steroid erklärt werden. Man müßte dazu annehmen, daß der Komplex entweder schlechter diffundiert oder schlechter in die Membran eingebaut wird.

Vergleicht man Herbicolin A mit dem Polyenantibiotikum Nystatin (Abb. 1), so stellt man eine begrenzte Ähnlichkeit fest. Wie im Nystatin, so sind auch im Herbicolin A

a)



b)

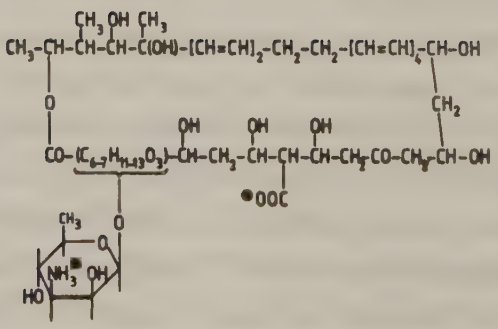


Abb. 1: Die Strukturen von

a) Herbicolin A (gegenwärtiger Stand der Strukturaufklärung)

b) Nystatin (Teilstruktur, aus (9))

einige Hydroxy-Gruppen vorhanden, die einen hydrophilen Bereich ergeben. Ferner liegt in beiden ein Lactonring vor, und beide besitzen eine positive Ladung in Form einer Ammonium- bzw. einer Guanidino-Gruppe. Das Vorhandensein der C=C-Doppelbindung im Herbicolin A ist für dessen Aktivität nicht unbedingt erforderlich.

2.2. Lytische Eigenschaft von Herbicolin A gegen Humanerythrocyten

Aufgrund des amphiphilen Charakters war zu vermuten, daß Herbicolin A Hämolyse verursacht. Dazu wurde die Dosis-Wirkungskurve von Herbicolin A an Humanerythrocyten bestimmt (Abb. 2). Um die Lyseaktivität verschiedener Substanzen vergleichen zu können, wird üblicherweise der Wert angegeben, bei welchem 50 % der Erythrocyten lysiert sind (c_{50}-Wert) (Tabelle 4).

Tab. 4: c_{50}-Werte von Herbicolin A und anderer hämolytischer Verbindungen (aus Abb. 2 entnommen)

Verbindung	c_{50}-Wert [mol x l^{-1}]
Melittin	2.8×10^{-7}
Herbicolin A	6.0×10^{-6}
Trichotoxin A 40	3.8×10^{-5}
Alamethicin F 50	1.6×10^{-5}

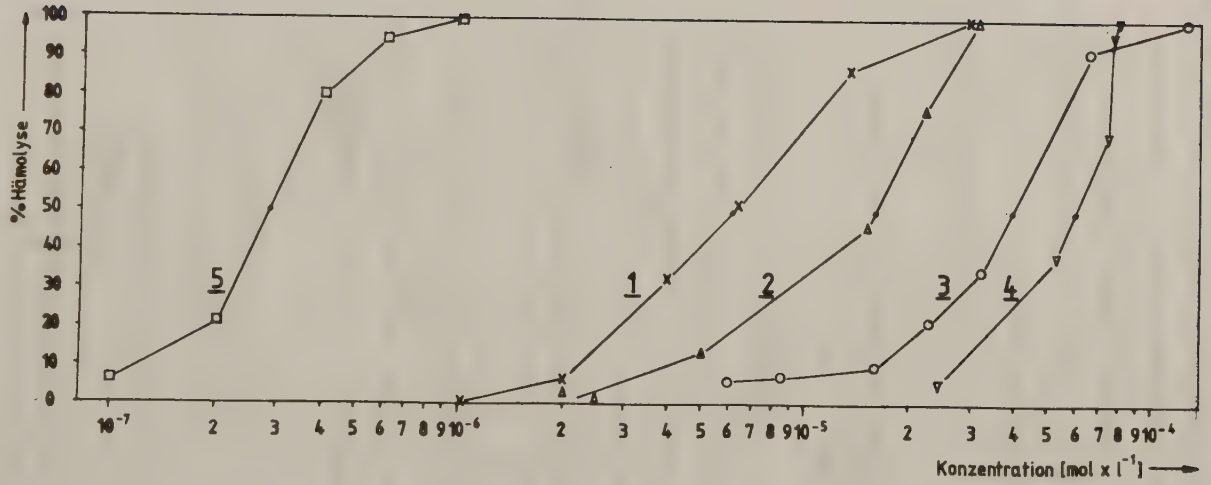


Abb. 2: Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse von Herbicolin A (1) im Vergleich zu Alamethicin F 50 (2), Trichotoxin A 40 (3), Natriumdodecylsulfat (4) und Melittin (5). Die Werte von 2 und 3 wurden aus (13) übernommen, vergl. auch (14)

2.3. Lytische Wirkung von Herbicolin A auf Protoplasten, isoliert aus Kalluszellen von Daucus carota L.*

Da Erwinia herbicola als phytopathogen beschrieben wird (1), war zu untersuchen, ob dies durch die lytische Eigenschaft des produzierten Antibiotikums verursacht sein kann. Lyse-Experimente wurden meines Wissens an derartigen Protoplasten noch nie durchgeführt. Die besondere Schwierigkeit bei solchen Untersuchungen liegt in der Isolierung stabiler Protoplasten, deren Stoffwechsel noch voll funktionsfähig ist. Denn anders als bei Humanerythrocyten werden die Protoplasten wesentlich langsamer angegriffen, so daß eine lytische Schädigung erst nach etwa 15 Stunden zu erkennen ist. Nach dieser Zeit ist aber die Zellwandsynthese schon wieder so weit fortgeschritten, daß eine merkliche Stabilisierung der Membran zu erwarten ist. Ist aber der Stoffwechsel der Protoplasten nicht mehr intakt, so lysieren sie zum großen Teil von selbst.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der enormen Haftfähigkeit der Protoplasten an Glas- und Kunststoffwandungen, so daß beim Abpipettieren der Protoplasten-Suspension nicht

---

* Herrn Dr. Chr. Langebartels, jetzt BFA für Landwirtschaft, Braunschweig, danke ich recht herzlich für die Isolierung der Protoplasten und für die freundliche Unterstützung bei den Versuchen.

immer gleiche Konzentrationen entnommen werden. Somit streuen die Meßwerte nicht nur stark, sondern man erhält für verschiedene Meßreihen unterschiedliche Dosis-Wirkungskurven. Als Vergleich wurden Alamethicin F 50, Trichotoxin A 40 und Suzukacillin in die Testreihe mit einbezogen. Innerhalb der Genauigkeit der Versuche wurden keine Unterschiede zwischen Alamethicin F 50, Trichotoxin A 40 und Suzukacillin festgestellt.

Der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der Lyse von Erythrocyten (Abb. 2) und Protoplasten (Abb. 3) zeigt, daß Herbicolin A gegen Humanerythrocyten etwa dreimal wirksamer ist als gegen Protoplasten. Alamethicin F 50 und Trichotoxin A 40 lysieren dagegen Protoplasten bei geringeren Konzentrationen als Humanerythrocyten. Diese Unterschiede sind nicht so gravierend, daß daraus ein anderer Lysemechanismus abgeleitet werden könnte. Ursächlich sind vermutlich die verschiedenartigen Zellmembranstrukturen und -bestandteile.

Die Differenzen könnten aber auch teilweise auf die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden zurückzuführen sein. Während bei der Hämolyse der austretende Blutfarbstoff innerhalb kurzer Zeit direkt photometrisch bestimmt wird, läß sich die Lyse von Protoplasten nur unter dem Mikroskop bestimmen. Dabei werden die intakten Protoplasten ausgezählt und in Relation zur ursprünglichen Konzentration bzw. zum Nullwert gebracht. Diejenigen Protoplasten werden dabei nicht erfaßt, die trotz Schütteln an den Wandungen

kleben bleiben. Andererseits werden aber sicher zu viele als intakt angesehen, weil sie noch Kugelgestalt besitzen, obwohl ihre Membran schon geschädigt ist.

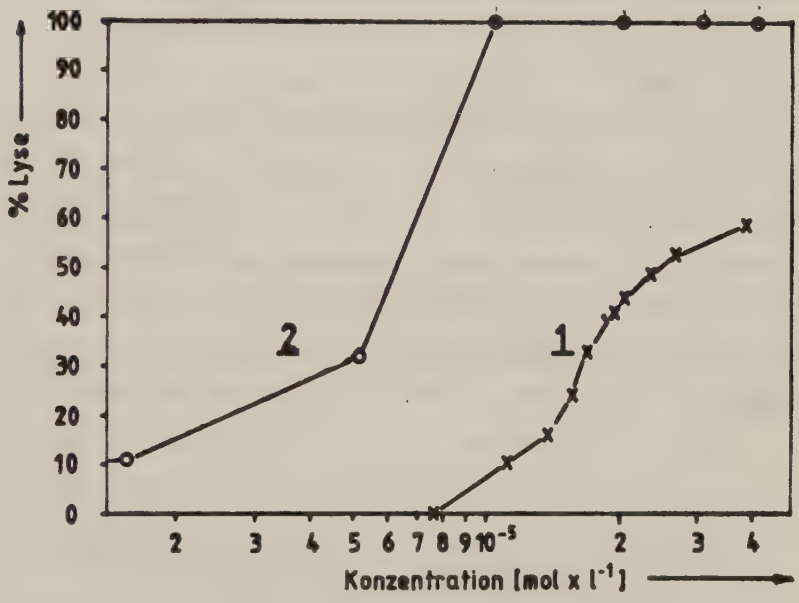


Abb. 3: Dosis-Wirkungskurven der Lyse von Protoplasten. 1: Herbicolin A; 2: Alamethicin F 50, Trichotoxin A 40 und Suzukacillin. Die Protoplasten wurden aus Kalluszellen von Daucus carota L. isoliert; ausgezählt wurde 18 Stunden nach Antibiotikumszugabe; Mittelwerte aus 3 Meßreihen, jeweils Dreifachbestimmungen

Üblicherweise wird für die Zellwandverdauung ein Cellulase-Rohenzymgemisch verwendet, welches aus dem Fadenpilz Trichoderma viride isoliert wurde. Trichoderma viride Stämme produzieren lytisch wirkende Polypeptide wie Alamethicin, Trichotoxin, Suzukacillin. Viele Arbeitsgruppen haben Schwierigkeiten mit der Stabilität der so isolierten Protoplasten (Protoplastentagung, August 1983, Basel*). Wenn in dem Rohenzymgemisch noch geringe Mengen an einem dem Alamethicin ähnlichen Antibiotikum vorhanden sind, so wäre diese Instabilität, die auch bei den von uns durchgeführten Lyse-Experimenten beobachtet wurde, erklärbar. Diese Labilität machte sich sehr unangenehm bemerkbar, da sich auch immer der Bezugswert zum Teil sehr stark verändert.

2.4. Einfluß von Herbicolin A auf die Sauerstoffentwicklung bei Chloroplasten, isoliert aus Radieschenkeimlingen**

Der als Photosynthese bezeichnete Reaktionskomplex besteht aus einer Vielzahl von Einzelreaktionen. Obwohl sehr

---

* Chr. Langenbartels, persönliche Mitteilung

** Herrn Prof. Dr. H. Metzner (Inst.f.Chem. Pflanzenphysiologie, Universität Tübingen) danke ich für das Zustandekommen, Dr. K. Fischer für die Betreuung und meiner Frau, G. Lupp für die Durchführung dieser Untersuchungen.

detaillierte Vorstellungen über deren Ablauf bestehen, sind noch viele Fragen ungeklärt. Bei der Photosynthese kommt der Photolyse des Wassers eine zentrale Bedeutung zu:

$$H_2O \xrightleftharpoons{\text{Licht}} 1/2\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^-$$

Doch nicht einmal die Herkunft des Sauerstoffs ist eindeutig geklärt. Stammt er wie in der Gleichung gezeigt direkt aus dem Wasser, oder wird Hydrogencarbonat photolytisch gespalten?
Über eine Folge von Reaktionen müssen Protonen und Elektronen in einer Elektronenkette letztendlich auf NADP übertragen werden, welches zu $NADPH_2$ reduziert wird. Dieses ist für die Reduktion von CO_2 zu Zuckereinheiten verantwortlich (Einzelheiten siehe Ref. 15,16).

Trotz des Protonentransports entsteht bei Belichtung im Innenraum der Thylakoide eine Anreicherung von Protonen, so daß der pH-Wert von etwa 8 auf 5 im Innenraum absinkt. Dieser Protonengradient ist die Grundlage für die Photophosphorylierung, die der Pflanze Energie zu speichern ermöglicht. Die Übersäuerung des Innenraums verschiebt außerdem das chemische Gleichgewicht der Photolyse so nach links, daß entsprechend weniger Sauerstoff und damit auch Protonen gebildet werden.

Eine künstliche Verminderung des Protonengradienten verursacht einerseits eine geringere Photophosphorylierung (geringere ATP-Bildung), andererseits eine Erhöhung der Sauerstoffentwicklung, da das Gleichgewicht weiter nach rechts verschoben wird. Das künstliche Abfangen oder Entfernen der Protonen im Innenraum der Thylakoide nennt man Entkopplung, da auf diese Weise die Sauerstoffproduktion nicht mehr von der Wasserstoffionenkonzentration und damit von der Geschwindigkeit der Photophosphorylierung abhängig ist. Zwei prinzipiell verschiedene Wege der Entkopplung stehen zur Verfügung. Die einfachste Möglichkeit besteht in der Zugabe von Ammoniumsalzen. Die damit im Gleichgewicht stehenden Ammoniakmoleküle können als ungeladene Teilchen die Thylakoidmembran passieren. Durch Assoziation mit den Protonen im Innenraum verringern sie den Protonengradienten (Abb. 4). Von anderen Entkopplern weiß man, daß sie Kanäle bilden können (z.B. Gramicidin A). Sind genügend dieser Löcher vorhanden, so bricht der Protonengradient zusammen.

Da Herbicolin A membranmodifizierende Eigenschaften besitzt (vergl. Abschnitt 2.2. und 2.3.), sollte untersucht werden, ob es bei der Photosynthese als Entkoppler wirken kann. Um dies festzustellen, kann sowohl die Steigerung der Sauerstoffentwicklung, als auch die Verminderung der ATP-Bildung (17) oder direkt der Protonengradient bestimmt werden. Erstere Methode wurde gewählt,

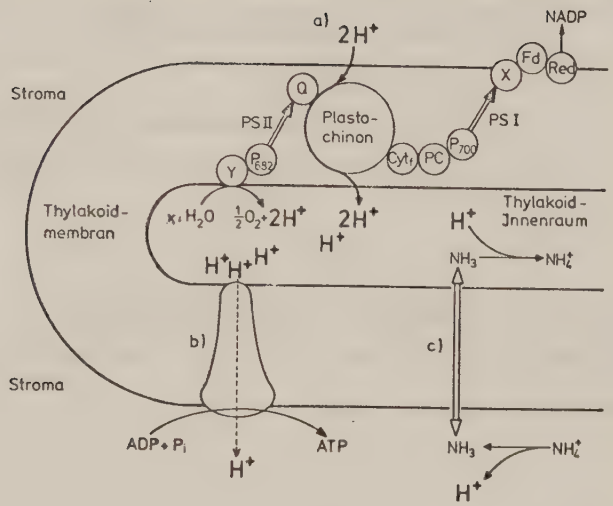


Abb. 4: Protonentransport durch die Thylakoidmembran (16)

a) Durch den photosynthetischen Elektronentransport gesteuerte Protonenaufnahme aus dem Stroma und Protonenfreisetzung im Innern des Thylakoids.

b) Bildung von ATP an der ATP-Synthetase beim Austritt von Protonen aus dem Thylakoidinneren.

c) Wirkungsweise des Entkopplers Ammoniumchlorid.

Y : Manganhaltiger, wasserspaltender Komplex

P_{682}: Reaktionszentrum des Photosystems II ($Chlorophyll\ a_{II}$)

Q : Primärer Elektronenakzeptor des PS II

Plastochinon: Plastochinon 9, fungiert als Protonenpumpe

Cyt.f: Cytochrom vom f-Typ

PC : Plastocyanin (kupferhaltiges Proteid)

Fortsetzung der Legende zu Abb. 4

P_{700} : Reakt.zentrum des Photosystems I (Chlorophyll a_I)

X : Primärer Elektronenakzeptor des PS I

Fd : Ferredoxin (Eisen-Schwefel-Protein)

da sie die einfachste und störunanfälligste ist. Abb. 5 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Entkopplung mit Ammoniumchlorid.

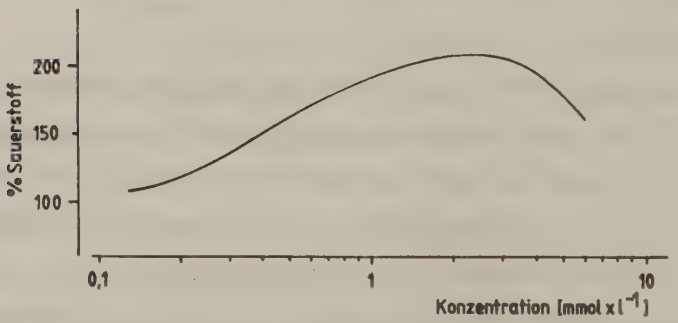


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Entkopplung mit Ammoniumchlorid

Völlig anders verläuft die Kurve der konzentrationsabhängigen Entkopplung bei den zu Herbicolin A parallel untersuchten Polypeptidantibiotika Alamethicin F 50 und Trichotoxin A 40. Diese entkoppeln bei wesentlich geringeren

Konzentrationen, und die entkoppelnde Wirkung setzt sprunghaft ein (Abb. 6).

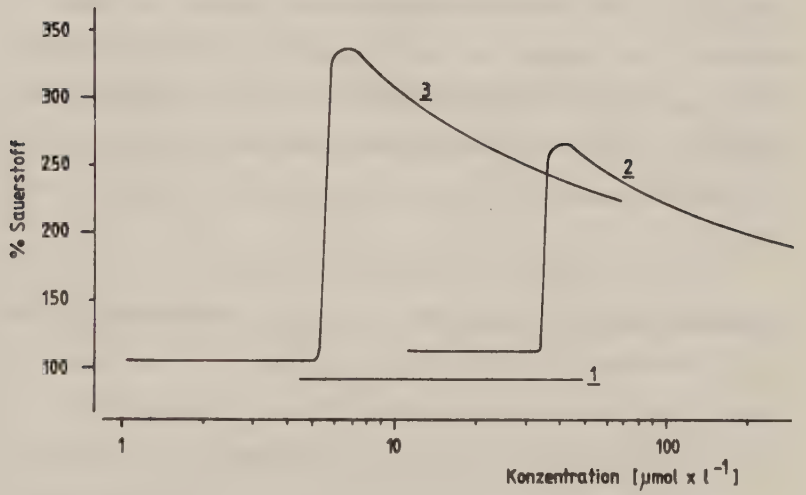


Abb. 6: Sauerstoffentwicklung an Chloroplasten (isoliert aus Radieschenkeimblättern) bei Zugabe steigender Mengen an Herbicolin A (1), Trichotoxin A 40 (2) und Alamethicin F 50 (3). Die ohne Zugabe beobachtete Sauerstoffentwicklung ist gleich 100 % gesetzt

Dieser plötzliche Anstieg der Sauerstoffentwicklung könnte damit erklärt werden, daß sowohl Alamethicin F 50 als auch Trichotoxin A 40 befähigt sind, in Lipid-Doppelschichten spannungsabhängige Poren zu bilden (18-20), wobei die

Einzelporen von Alamethicin F 50 eine längere Lebensdauer besitzen als die von Trichotoxin A 40. Bei MUELLER und RUDIN (21) wird zudem die Möglichkeit eines aktiven Ionentransports durch die Lipidmembran, bei Zugabe von Alamethicin F 50, diskutiert. Ob die Potentialdifferenz, bedingt durch den Protonengradienten an der Thylakoidmembran ausreicht, um spannungsabhängige Poren zu bilden, soll eine überschlagsmäßige Spannungsberechnung veranschaulichen:

Die Nernst'sche Gleichung für eine Konzentrationskette lautet:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_1}{a_2} ; \quad E = \frac{RT}{F} (\ln a_1 - \ln a_2);$$

oder

$$E = 0.058 (\lg a_1 - \lg a_2)$$

$$E = 0.058 (8 - 5) = 0.174 \text{ Volt}$$

Dieser Wert kann aber nur dann gelten, wenn sonst keinerlei Potentiale (z.B. durch Konzentrationsunterschiede) vorhanden sind. Dies ist aber nicht der Fall, da nicht nur Ionen-, sondern auch noch Elektronenpotentiale vorhanden sind. Aus diesem Grunde werden auch nur Werte von 80 (22) bis 118 mV (23) gemessen.

Nach G. BOHEIM (20) werden Einzelporen von Trichotoxin A 40 und Alamethicin F 50 schon ab etwa 50 mV an Lipidbilayern

beobachtet. Demnach wäre die an der Thylakoidmembran anliegende Spannung bei Belichtung ausreichend, um spannungsabhängige Poren zu induzieren. Nach Untersuchungen von G. BOHEIM (Universität Bochum) bildet Herbicolin A keine spannungsabhängige Poren. Deshalb ist es auch verständlich, daß Herbicolin A in Konzentrationsbereichen, in denen Alamethicin F 50 und Trichotoxin A 40 entkoppeln, keinen Effekt zeigt.

Eine andere Ursache ist ebenfalls überlegenswert. Die antibiotische Wirkung von Herbicolin A ist eng mit dem Vorhandensein von Steroiden in der Membran verknüpft. Es ist lange bekannt, daß die äußere Hüllmembran der Chloroplasten Steroide enthält. Über den Steroid-Gehalt in der inneren Membran, aus der sich durch Ausstülpung die Thylakoide bilden, werden jedoch sehr unterschiedliche Angaben gemacht. Die Bestimmungsschwierigkeit liegt in der Isolierung der reinen inneren Membran, frei von äußerer. Es läßt sich nicht vermeiden, daß mehr oder weniger große Mengen von der äußeren Membran mit isoliert werden, so daß sich zwar geringe, doch sehr unterschiedliche Steroid-Werte ergeben. Deshalb vermuten einige Arbeitsgruppen, daß die innere Membran keine Steroide enthält. Auch aus diesem Grunde ist die "Inaktivität" des Herbicolin A nicht überraschend. Es wäre höchstens noch zu untersuchen, ob nicht bei höheren Konzentrationen doch eine Entkopplung zu beobachten wäre.

2.5. Bilayer-Experimente*

Mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen an Lipid-Doppelschichten läßt sich feststellen, ob Antibiotika Poren oder Kanäle ausbilden, oder ob sie Carrier-Eigenschaften besitzen. Anfänglich wurde vermutet, daß Herbicolin A ein schwacher Carrier sein könnte, doch konnte dies bei ausführlicheren Messungen nicht bestätigt werden. Es wurden auch keine Poren oder Kanäle gebildet, im Gegensatz z.B. zu Alamethicin F 50 und Trichotoxin A 40 (18-20).

2.6. Mitogene Stimulation von B-Lymphocyten**

B-Lymphocyten können durch Zugabe von Lipopeptid (LP) oder Lipopolysaccharid (LPS) zur unspezifischen Immunantwort angeregt werden. Beim LP weiß man, daß hierzu nicht das Gesamtmolekül notwendig ist. Vielmehr genügt das N-terminale, kürzlich synthetisierte Triplamitoyl-pentapeptid, um B-Lymphocyten zu stimulieren (24). Auch beim LPS hat man festgestellt, daß das Lipid A (ein Teil des LPS) zur

---

* Herrn Prof. Dr. G. Boheim und seinen Mitarbeitern, Ruhr-Universitä Bochum, danke ich für die Bilayer-Experimente

** Herrn Prof. Dr. W.G. Bessler danke ich vielmals für die Durchführung dieses Versuchs

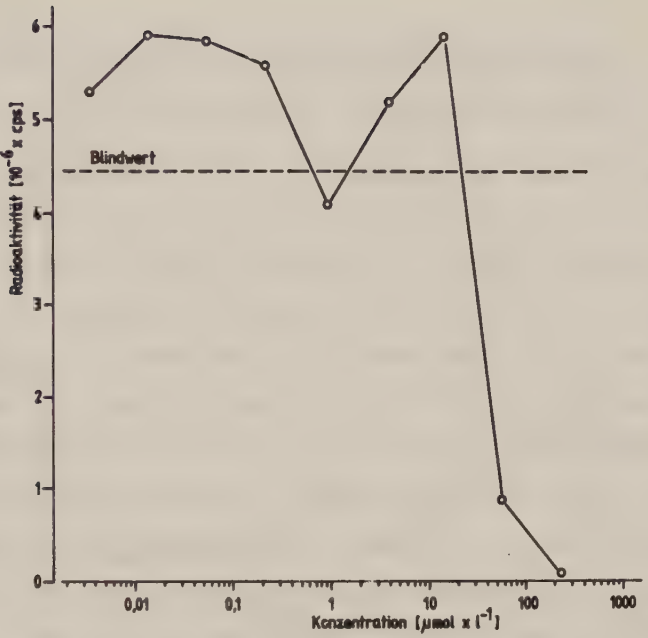


Abb. 7: Dosis-Wirkungskurve der B-Lymphocyten durch Zugabe von Herbicolin A

Anregung ausreicht. Lipid A enthält Glucosederivate die mit 3-Hydroxymyristinsäure acyliert sind (25). Beim Herbicolin A dagegen ist die Glucose glycosidisch an 3-Hydroxymyristinsäure gebunden. Deshalb sollte untersucht werden, ob Herbicolin A zur mitogenen Stimulation befähigt ist. Die Versuche zeigten, daß Herbicolin A keine derartige Stimulation bewirkt. Es wirkt vielmehr in höheren Konzentrationen cytotoxisch (Abb. 7). Durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin läßt sich die erhöhte Zellteilungsrate nachweisen.

2.7. Wirkung von Herbicolin A auf die Aktivität der Guanylatcyclase von Paramecium tetraurelia*

Paramecien haben die Eigenschaft, je nach Calciumionenkonzentration, ihr Fortbewegungsverhalten zu ändern. Diese Fähigkeit ist auf selektiv Ca^{2+}-permeable Kanäle zurückzuführen, wobei die calcium- und calmodulin-abhängige Guanylatcyclase verschieden stark aktiviert wird. Daher kann aus der Aktivität der Guanylatcyclase auf die Durchlässigkeit der Cilienmembran für Calciumionen geschlossen werden. So steigern Porenbildner wie Alamethicin F-50 die Enzymaktivität beträchtlich. Herbicolin bildet wie unter Abschn. 2.5. angedeutet in Lipidmembranen keine Poren, es besitzt jedoch stark lytische Eigenschaften. Aus diesem Grunde wurde Herbicolin A ebenfalls untersucht.

---

* Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz und S. Klumpp, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, danke ich sehr herzlich für die Durchführung dieser Untersuchung.

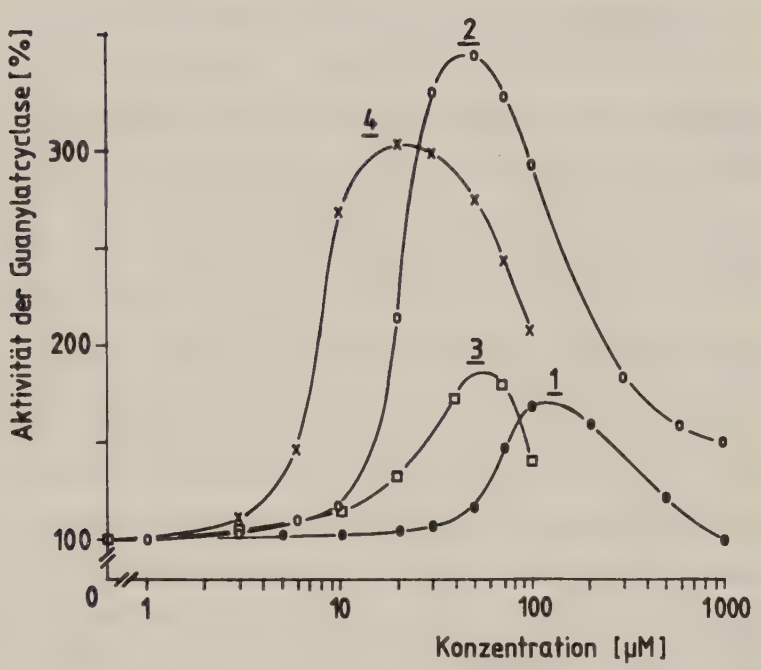


Abb. 8: Aktivität der Guanylatcyclase von Paramecium nach Zugabe steigender Mengen an Herbicolin A (1), Alamethicin F 50 (2), Trichotoxin A 40 (3) und Suzukacillin (4).

3. PROBLEMSTELLUNG

Schwerpunkt dieser Dissertation ist die Strukturuntersuchung des Glyco-Lipo-Peptid-Antibiotikums Herbicolin A. Ferner sollten durch chemische Derivatisierung Hinweise über die Wirkungsweise erhalten werden.

Um Strukturuntersuchungen überhaupt durchführen zu können, muß das Antibiotikum nicht nur hoch rein, sondern auch unverändert vorliegen. Diese letztgenannte Bedingung ist zwar trivial, doch bei einer sehr empfindlichen Verbindung, wie sie Herbicolin A darstellt, nicht so einfach zu erfüllen. Während für biologische Tests eine Reinheit von z.B. 90 % meist vollkommen ausreicht, ist eine derart unreine Substanz für Strukturuntersuchungen nur bedingt verwendbar.

Um ausreichende Versuchsmengen bereitstellen zu können, war es notwendig die Gewinnung des Antibiotikums aus dem Kulturmedium* zu optimieren. Auf Grund seines amphiphilen Charakters ist Herbicolin A nur gut löslich in niederen Alkoholen und in Aceton/Wasser (2:1). Es ist sehr labil gegen verdünnte Säuren und Basen. Daher wird die Palette

---

* Das Kulturmedium wurde von Herrn Prof. Dr. G. Winkelmann (Mikrobiologie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

der möglichen Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren sehr stark eingeschränkt. Da auch an Kieselgel sehr viel an biologischer Aktivität verloren geht, kam eine präparative Chromatographie an Kieselgel oder an modifiziertem Kieselgel (z.B. Reverse Phase) nicht in Frage. Bei schnellen analytischen Trennungen ist dieser destruktive Effekt jedoch gering, so daß Dünnschichtchromatographie und HPLC durchaus zur Reinheitskontrolle angewandt werden können.

4. GEWINNUNG UND REINIGUNG VON HERBICOLIN A

Die Fermentation von Erwinia herbicola A 111 erfolgt in einem Medium nach Davis und Mignoli (abgewandelt), in einem Liter sind enthalten: 7 g K_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0.5 g tri-Na-citrat x 2 H_2O, 0.1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 2 g $(NH_4)_2SO_4$ und 20 g Glucose. Die Salz- und Glucoselösungen werden getrennt sterilisiert.

3 Tage alte Kulturen von Erwinia herbicola wurden direkt über eine Säule mit dem Adsorberharz Servachrom XAD-2 gegeben. Polare Substanzen und restliche Bakterienzellen wurden mit entionisiertem Wasser ausgewaschen, und die lipophilen Bestandteile der Zellkultur (einschließlich der Herbicoline) wurden mit Methanol eluiert. (Das ursprüngliche Verfahren, mit Aceton/Wasser Farbstoffe und andere Substanzen von der Säule zu waschen, wurde fallengelassen, da dabei zuviel Herbicolin mit eluiert wurde). Der nach Abdampfen des Methanols erhaltene Rückstand wurde einer Gelchromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol unterworfen. Um die letzten Verunreinigungen zu entfernen, wurde das Roh-Herbicolin durch multiplikative Gegenstromverteilung gereinigt. Bewährt hat sich dazu ein Lösungsmittelsystem aus 2-Butanol/Essigsäureethylester/Wasser (1:2:1.5). Die Löslichkeit von Herbicolin A ist in diesem System allerdings nicht sehr gut, da das Antibiotikum einen ausgeprägt amphiphilen Charakter besitzt.

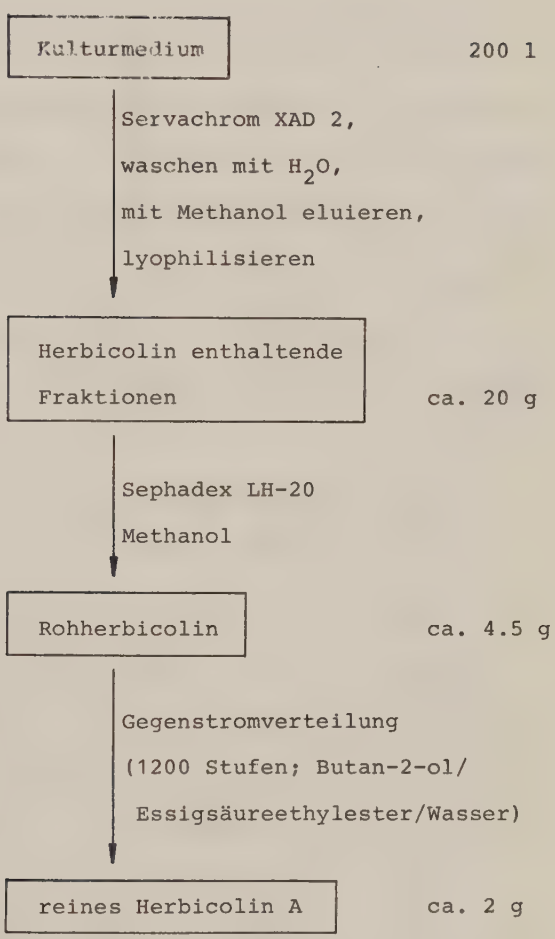


Abb. 9: Reinigungsschema von Herbicolin A

Aus diesem Grunde mußte eine sehr hohe Stufenzahl gewählt werden, was zwangsläufig eine beträchtliche Bandenverbreiterung zur Folge hat. Das so erhaltene Herbicolin A enthält nur noch geringe Spuren an Verunreinigungen, wie an Hand der Dünnschichtchromatographie (Abb. 10) und HPLC (Abb. 11) zu erkennen ist. Die geringen Mengen an Herbicolin B wandern unter den bei der Multiplikativen Gegenstromverteilung angewandten Bedingungen schneller. So ist im Überlauf neben lipophilen Bestandteilen auch Herbicolin B nachweisbar.

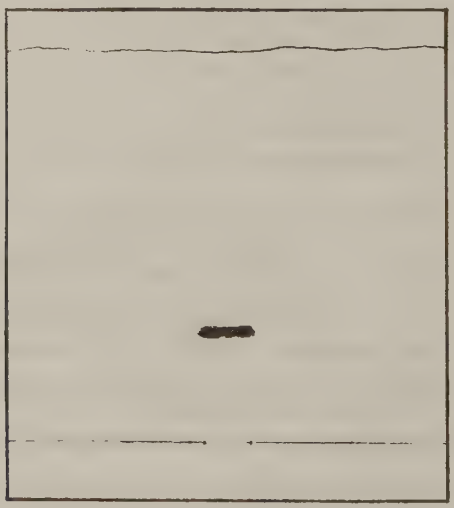


Abb. 10: Dünnschichtchromatographie von Herbicolin A; Fließmittelsystem: $CHCl_3/CH_3OH/AcOH/H_2O$ (35:40:3:4) (v/v)

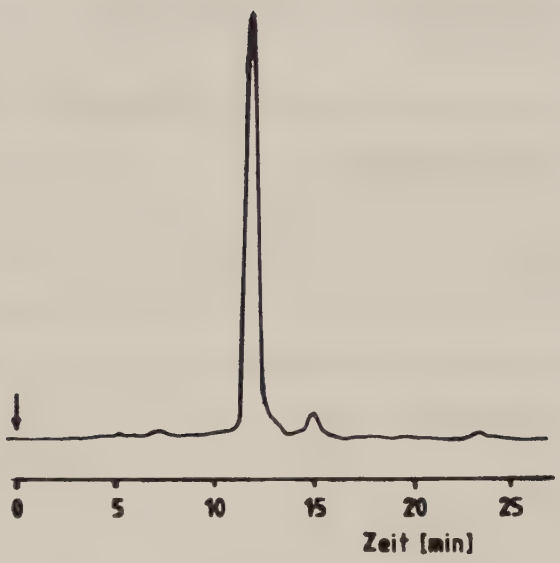


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm von Herbicolin A; Säule: LiChrosorb-NH_2 (7 µm), 250 x 8 mm; Fließmittel: 75 % CH_3CN/25 % 0.01 M NaH_2PO_4; Fließgeschwindigkeit: 7.0 ml/min; Detektor: Schöffel Spektroflow-Monitor 770, Detektion: 210 nm; Empfindlichkeit: AU = 0.02

5. CHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG

5.1. Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie

In Tabelle 5 sind die R_F-Werte von Herbicolin A und B in verschiedenen Lösungsmitteln gegenübergestellt.

Tab. 5: R_F-Werte von Herbicolin A und B auf Kieselgelfertigplatten.

Lösungsmittel-System		Herbicolin A	Herbicolin B
I	Chloroform/Methanol/Eisesig/ Wasser (40:35:3:4)	0.37	0.91
II	Chloroform/Methanol/Eisessig/ Wasser (65:25:3:4)	0.12	0.46
III	Chloroform/Methanol/Eisessig/ Wasser (35:40:3:4)	0.28	0.72
IV	Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)	0.02	0.10
V	Chloroform/Methanol/17 proz. Ammoniaklösung (70:35:10)	0.07	0.31
VI	Butan-1-ol/Eisessig/Wasser (80:20:20)	0.16	0.27
VII	Propan-1-ol/Wasser (70:30)	0.09	0.38
VIII	Methylethylketon/Pyridin/Eisessig/ Wasser (70:15:2:15)	0.37	0.50

Neben dieser dünnschichtchromatographischen Charakterisierung kann Herbicolin A und B auch mittels HPLC auf Reinheit untersucht werden (Abb. 11 und 12).

Eine weitere Möglichkeit der chromatographischen Charakterisierung besteht in der Dünnschichtchromatographie des Totalhydrolysats von Herbicolin A. Um auch Komponenten erkennen zu können, die mit den üblichen Anfärbereagentien nicht oder nur schlecht zu erkennen sind, wurde nach der Hydrolyse dansyliert und auf Polyamidfolien (Wang-Folien) chromatographiert (27,28) (Abb. 13).

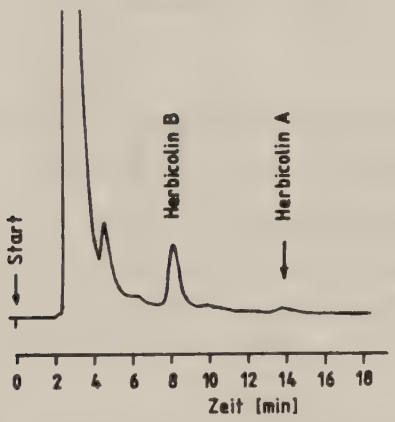


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm von Rohherbicolin B, zur Demonstration der Trennfähigkeit des Systems. Säule: 250 x 4 mm mit LiChrosorb-NH_2 (5 µm); Fließmittelsystem: 80 % CH_3CN, 20 % 0.01 M KH_2PO_4; 1 ml/min Pumpgeschwindigkeit; Detektion: UV-Absorpt. (210 nm); Empfindlichkeit: AU = 1.0

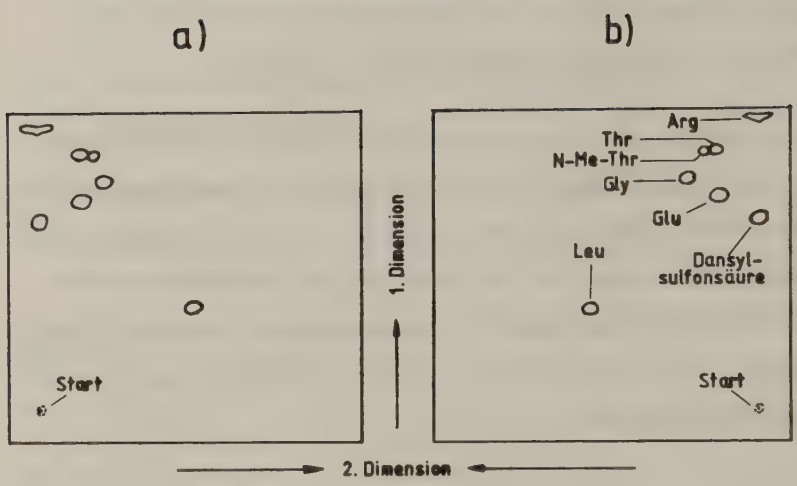


Abb. 13: Dünnschichtchromatographie des dansylierten Totalhydrolysats von Herbicolin A (a) und einer Dansyl-Aminosäuremischung (b). 1. Dimension: 4 % Ameisensäure in Wasser; 2. Dimension: 20 % Essigsäure in Toluol

Auch durch HPLC lassen sich die einzelnen Bestandteile des Totalhydrolysats trennen, charakterisieren und identifizieren (Abb. 14 und 15).

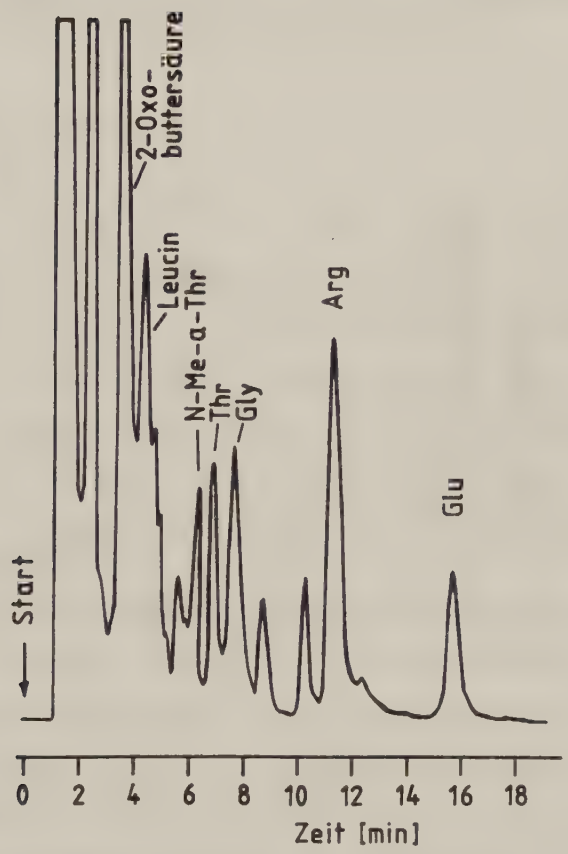


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm des Herbicolin A Totalhydrolysats. Säule: 250 x 4 mm, LiChrosorb-NH_2 (7 µm); Fließmittel A: CH_3CN/H_2O (500:70), B: 0.01 M KH_2PO_4, Anfangsbedingungen: 5 % B, Gradient innerhalb von 10 min auf 25 % B (linear); Pumpgeschwindigkeit: 3.0 ml/min; Detektion: UV-Absorption (210 nm); Empfindlichkeit: AU = 0.1

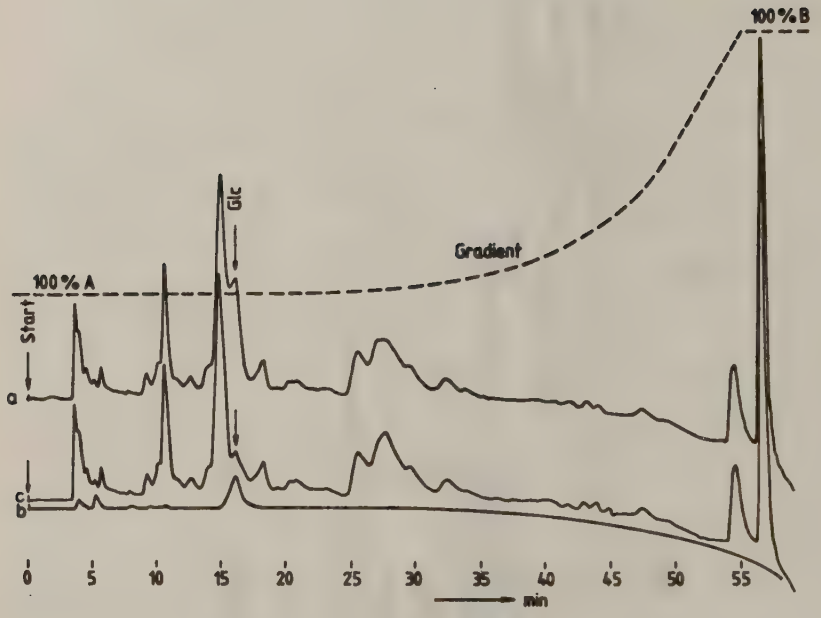


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm des im Herbicolin A enthaltenen Zuckers. Säule: 250 x 4 mm, LiChrosorb-NH_2 (5 µm); Fließmittel A: 80 % CH_3CN/14 % H_2O/6 % 0.01 M KH_2PO_4, B: 50 % CH_3CN/33 % H_2O/17 % 0.01 M KH_2PO_4; Pumpgeschwindigkeit: 1.0 ml/min; Detektion: UV-Absorption (190 nm); Empfindlichkeit: AU = 0.4

5.2. Quantitative Aminosäurenanalyse von Herbicolin A durch Ionenaustauschchromatographie

5.2.1. Saure Totalhydrolyse

Für die Bestimmung wurde Herbicolin A bei 110°C 18 Stunden in 6 N HCl hydrolysiert. Die Aminosäurenzusammensetzung wurde auf einem BIOTRONIK-AMINOSÄUREANALYSATOR LC 6000 E ermittelt. Das Verhältnis der Aminosäuren ist danach 2 Threonin: 1 Glutaminsäure (Glx): 2 Glycin: 1 Leucin: 1 Arginin. Zusätzlich wurde mind. 1 Ammoniak gefunden. Es war anzunehmen, daß dieser entweder aus Glutamin oder aus der 2,3-Dehydroaminosäure stammt, da diese bei der Hydrolyse in 2-Ketosäuren umgewandelt werden (29). Der nach der Totalhydrolyse beobachtete charakteristische Geruch nach Suppenwürze stammt von der 2-Keto-buttersäure.

5.2.2. Alkalische Hydrolyse (30)

Herbicolin A wurde 8 Stunden mit 4-prozentiger $Ba(OH)_2$-Lösung auf 105°C erhitzt. Dabei wird nicht nur starke Racemisierung, sondern auch Zerstörung vieler Aminosäuren beobachtet. So ist danach kein Threonin mehr nachweisbar. Außerdem findet man statt Arginin Ornithin und statt Glutaminsäure α-Aminobuttersäure, welche das gleiche Elutionsverhalten wie Cystein bei der Ionenaustauschchromatographie besitzt. Daß es sich hierbei um α-Amino-

buttersäure handelt, ließ sich durch vergleichende Aminosäurenanalyse und durch kombinierte Gaschromatographie/ Massenspektrometrie ermitteln.

5.3. Identifizierung der Dehydroaminosäure

Das ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A zeigt zwei Signale, die einer C=C-Doppelbindung zuzuordnen sind. Durch katalytische Hydrierung können diese Signale zum Verschwinden gebracht werden. Wird von hydriertem Herbicolin A eine Aminosäurenanalyse durchgeführt, so erscheint zusätzlich eine Aminosäure, die das Elutionsverhalten des Cysteins aufweist (vgl. Abschn. 5.2.2.). Da bei der Aminosäurenanalyse Cystein und Aminobuttersäure gleichzeitig eluiert werden (gleiches Elutionsverhalten), war eine weitere Charakterisierung dieser Aminosäure notwendig. Würde es sich um Cystein handeln, so hätte diese mit Perameisensäure zu Cysteinsäure oxidiert werden können. Da dieser Versuch keine Cysteinsäure ergab, mußte es sich bei dieser Aminosäure um Aminobuttersäure handeln. Dies konnte durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie bestätigt werden. Außerdem wurde in der gaschromatographischen Trennung an chiraler Phase D- und L-Aminobuttersäure gefunden (Abb. 16 und 17).

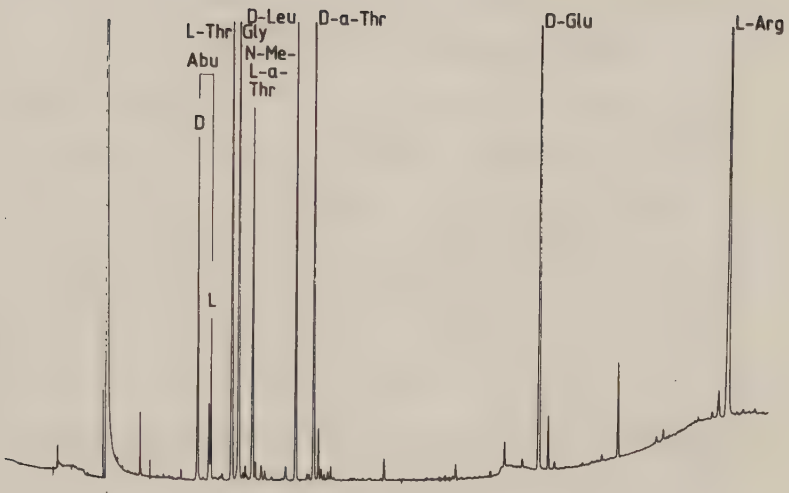


Abb. 16: Gaschromatogramm des Totalhydrolysats von katalytisch hydriertem Herbicolin A (Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester an Chirasil-Val-Glaskapillarsäule)

Abb. 17: Massenspektrum von a) synthetischer und b) isolierter Aminobuttersäure

5.4. Identifizierung und Konfigurationsbestimmung der im Herbicolin A enthaltenen Aminosäuren*

Hierzu wird Herbicolin A sauer totalhydrolysiert, die Aminosäuren derivatisiert und die Konfiguration gaschromatographisch an einer Chirasil-Val-Säule bestimmt. Zusätzlich konnte das Ergebnis der Aminosäurenanalyse bestätigt werden. Die Konfigurationen der einzelnen Aminosäuren ergaben sich wie folgt (vergl. (2)): L-Thr, D-Leu, D-allo-Thr, D-Glu, L-Arg und Gly (Abb. 18). Bei der gaschromatographischen Untersuchung tritt neben D-Leu etwa mit der Retentionszeit von L-Leu ein unbekannter Peak auf. Die massenspektrometrische Aufnahme zeigte, daß es sich hierbei um ein Threonin handeln muß. Vergleichschromatogramme bestätigten, daß D-allo-Threonin das gleiche Retentionsverhalten besitzt wie L-Leucin. Später konnten auf einer Chirasil-Val-Säule mit einer etwas anderen Polarität D-allo-Threonin und L-Leucin getrennt werden.

Daneben erschienen im Gaschromatogramm noch ein Peak, dessen Identifizierung anfänglich Schwierigkeiten bereitete. Der nicht sofort erklärbare Peak (der dritte in der Elutionsfolge, direkt nach Glycin) wurde zuerst Dihydroxyvaleriansäure zugeordnet. Eine eingehende Über-

---

* Herrn G.J. Nicholson danke ich vielmals für die Durchführung dieser GC- und GC/MS-Untersuchungen.

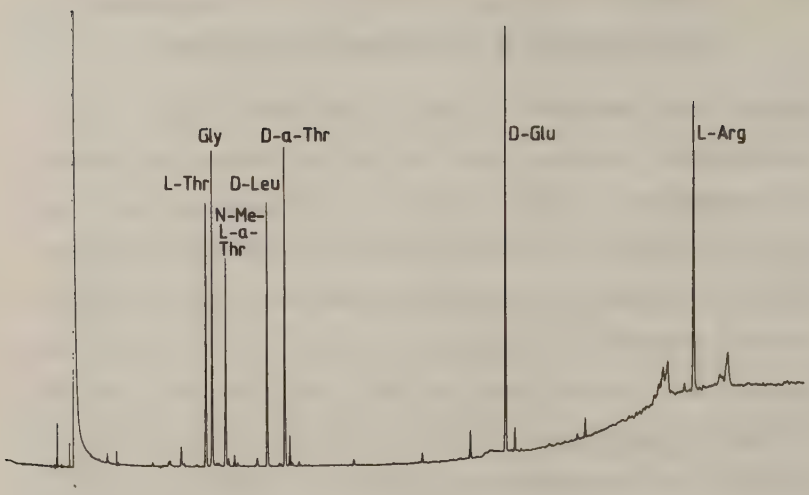


Abb. 18: Gaschromatographische Trennung der Aminosäuren im Herbicolin A (Chirasil-Val-Kapillarsäule, als Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester)

prüfung des Massenspektrums zeigte jedoch, daß eine ähnliche Fragmentierung wie beim Threonin vorliegt, nur mit einer um 14 höheren Masse. Homothreonin konnte es nicht sein, denn dieses wäre mit Ninhydrin anfärbbar und in der Aminosäurenanalyse auffindbar gewesen. In Frage kamen deshalb noch α-Methylthreonin (welches wie alle α-Dialkylaminosäuren schlecht mit Ninhydrin anfärbbar ist) oder N-Methylthreonin. Abbildung 19 und 20 zeigt, daß es sich um N-Methylthreonin handelt.

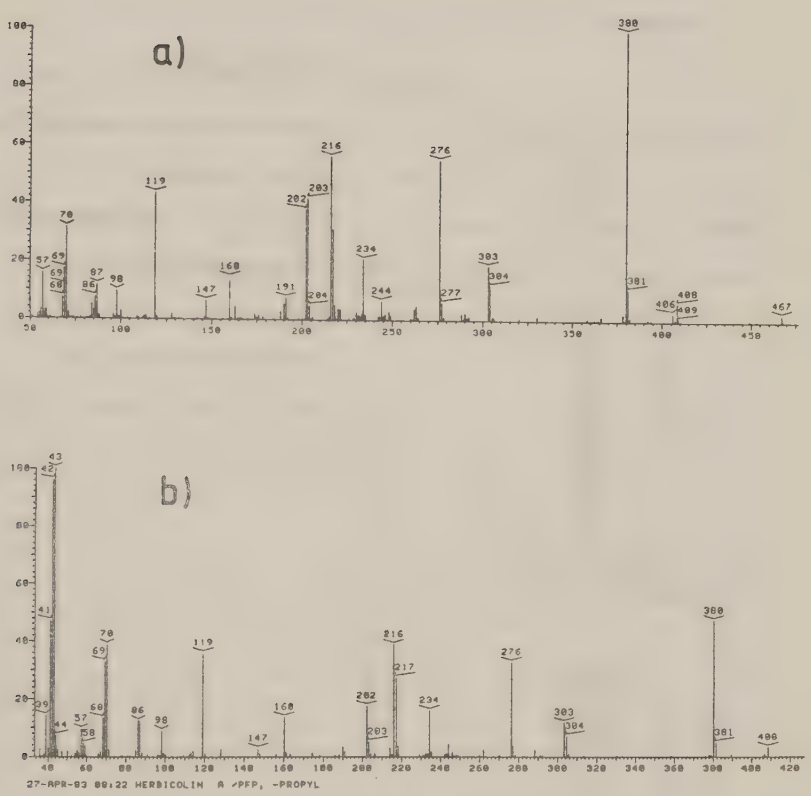


Abb. 19: Massenspektrum von a) synthetischem N-Methyl-allo-Threonin und b) aus Herbicolin A isoliertem, jeweils als Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester

Prof. König (Universität Hamburg) konnte zeigen, daß es sich hierbei um N-Methyl-L-allo-Threonin handelt (Abb. 20). Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde von

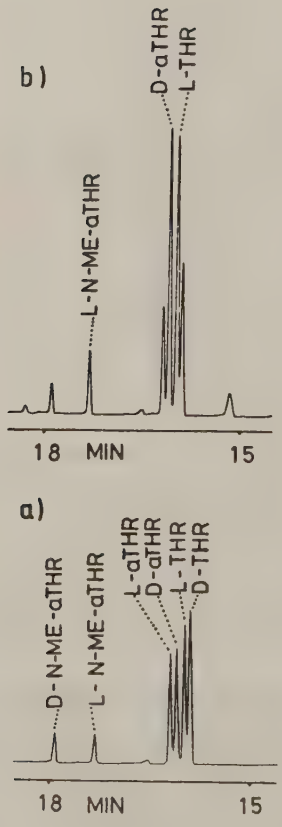


Abb. 20: Gaschromatographische Bestimmung der absoluten Konfiguration der im Herbicolin A enthaltenen Threonine nach Totalhydrolyse. a) synthetisches Gemisch, b) Herbicolin A-Hydrolysat plus a)

ihm die Diastereomerenmethode herangezogen, wobei die Trimethylsilyl-aminosäure-3-methyl-butyl-2-ester an einer SE 54 CB-Säule gaschromatographiert wurden. Die Gaschromatogramme zeigen außerdem, daß zusätzlich noch L-Threonin und D-allo-Threonin im Herbicolin A vorliegen.

5.5. Identifizierung und Konfigurationsbestimmung der Hydroxyfettsäure

Behandelt man Herbicolin A mit trockenem Methanol/HCl, so läßt sich der Methylester der Hydroxyfettsäure durch Extraktion mit n-Hexan oder Ether isolieren. Durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie wurde diese als β-Hydroxymyristinsäure bestimmt (Abb. 21 und 22).

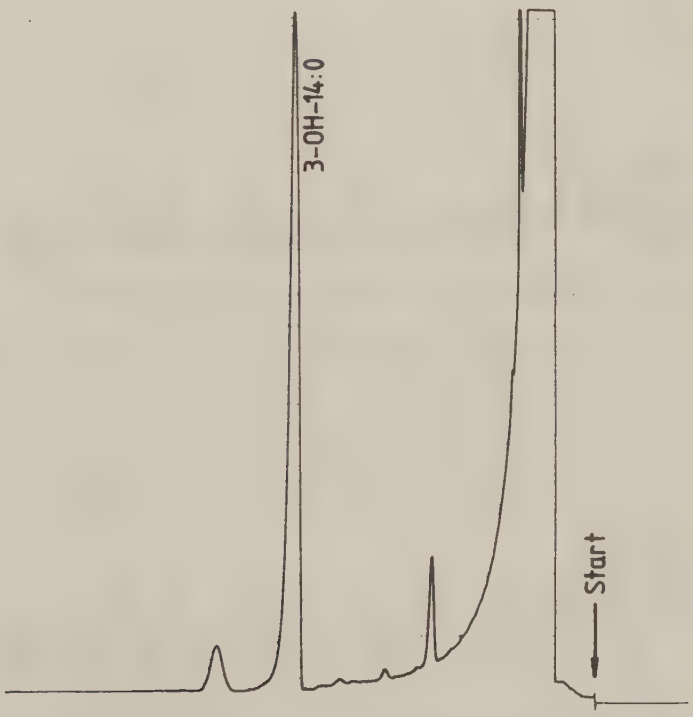


Abb. 21: Gaschromatographische Bestimmung der 3-Hydroxymyristinsäure aus Herbicolin A (als Methylester). Säule: OV-1; Temperaturprogramm von 100-200°C, 6°C/min

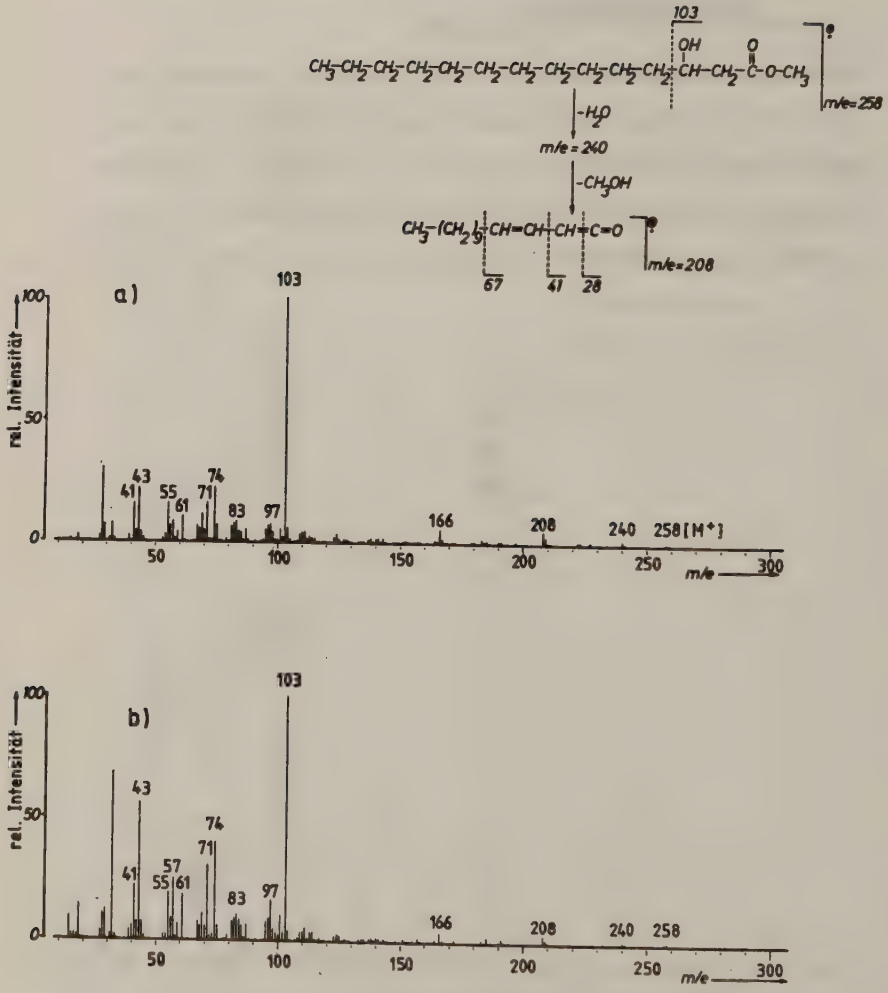


Abb. 22: Massenspektrum von β-Hydroxymyristinsäuremethylester; a) synthetisch,
b) isoliert aus Herbicolin A

Durch Gaschromatographie an einer chiralen Phase (31,32) wurde von Prof. König (Universität Hamburg) die Konfiguration der 3-Hydroxymyristinsäure als R(-) ermittelt (Abb. 23).

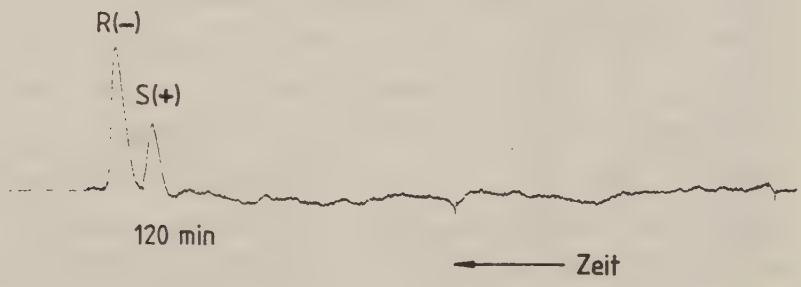


Abb. 23: Gaschromatographische Trennung von (+)-3-Hydroxymyristinsäure im Gemisch mit dem Hydrolysat von Herbicolin A als Isopropyl-urethan/Isopropylamidderivat. Zuordnung der Elutionsfolge mit bekannten Enantiomeren. Quarzkapillarsäule (25 m) mit XE-60-L-Valin-α-phenylethylamid, Temperatur: 225°C

5.6. Identifizierung des Zuckers im Herbicolin A

Insbesondere aufgrund des ^{13}C-NMR-Spektrums, aber auch wegen der Anfärbbarkeit mit Orcin/H_2SO_4 und Benzidin/Perjodat (33) wurde auf die Anwesenheit eines Zuckers im Herbicolin A geschlossen. Zur Identifizierung wurde

schonend hydrolysiert (6 N HCl/110°C/15 min) und der so abgespaltene Zucker sowohl durch HPLC (Abschn. 5.1., Abb. 15) als auch im Zuckeranalysator nachgewiesen.

Um die Verknüpfung der Glucose zu bestimmen, wurde Herbicolin A von Prof. König (Universität Hamburg) zuerst perdeuteromethyliert, dann schonend hydrolysiert (6 N HCl, 110°C, 15 min) und anschließend trimethylsilyliert. Das Massenspektrum beweist, daß die Glucose glycosidisch gebunden ist (Abb. 24). Zur Kontrolle wurde Rohrzucker unter gleichen Bedingungen behandelt und mit GC/MS untersucht. Die Massenspektren und Retentionszeiten der Glucosederivate von Rohrzucker und Herbicolin waren identisch (34).

^{13}C-NMR-Spektren von Methyl-α-D-glucopyranosid, Methyl-β-D-glucopyranosid und Herbicolin A lassen den Schluß zu,

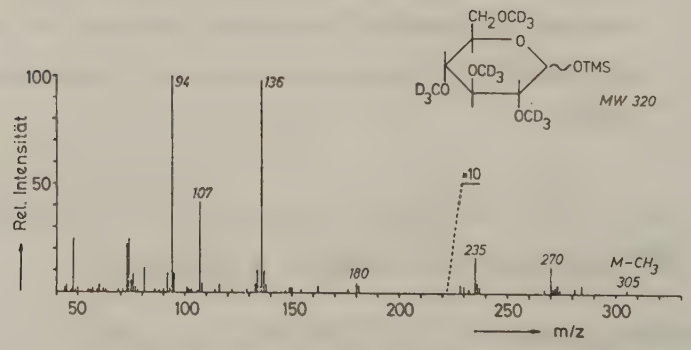


Abb. 24: Massenspektrum von Trimethylsilyl-2,3,4,6-O-perdeuteromethylglucosid

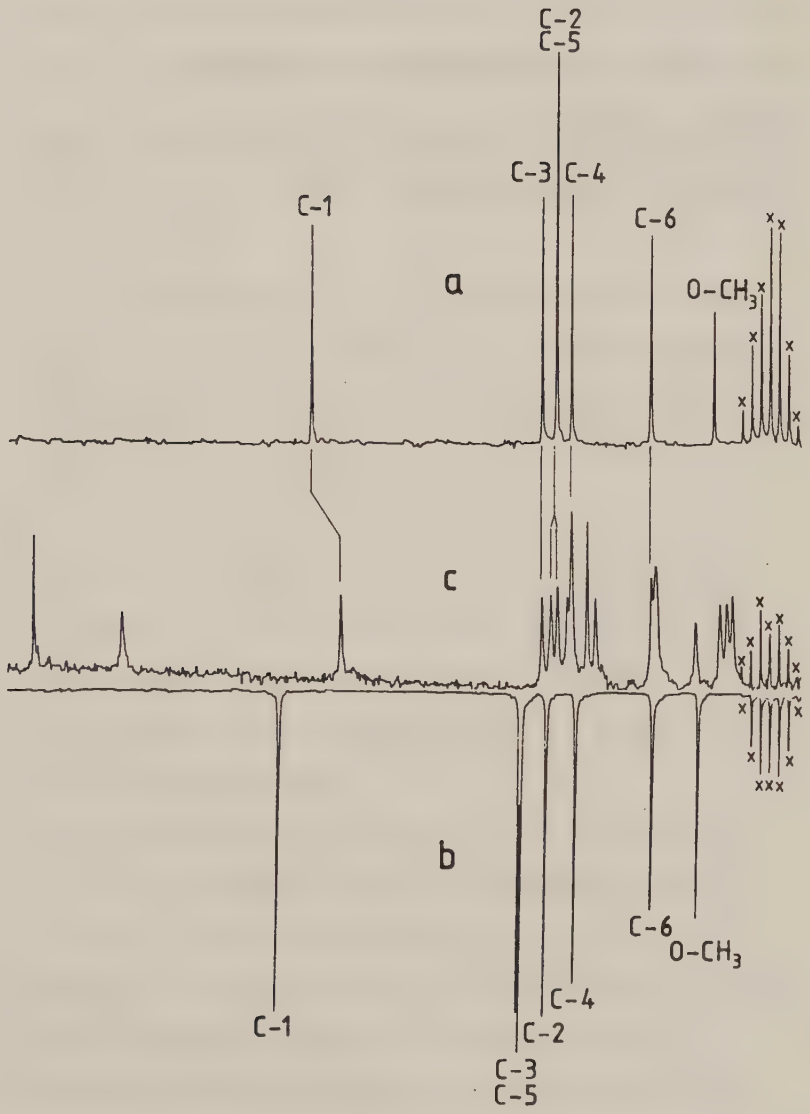


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Spektren von Methyl-α-D-glucopyranosid (a), Methyl-β-D-glucopyranosid (b) und Herbicolin-Teilspektrum (c). Alle Spektren wurden in CD_3OD (x) gemessen

daß im Herbicolin A die Glucose als α-Glucosid vorliegt (Abb. 25). Durch das Aglykon muß das Signal von C-1 der Glucose stärker beeinflußt werden als die restlichen. Damit kann die relativ starke Verschiebung des anomeren Kohlenstoffsignals im Herbicolin A gegenüber Methyl-α-D-glucopyranosid erklärt werden.

6. KERNRESONANZ-SPEKTREN VON HERBICOLIN A

6.1. ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A

Bereits aus dem in Abb. 26 dargestellten ^{13}C-NMR-Gesamtspektrum lassen sich eine Reihe von wichtigen Informationen entnehmen:

a) Im Aliphatenbereich fällt das sehr intensive Signal bei 30.7 ppm auf, welches durch eine lange Alkylkette hervorgerufen wird. Wie durch GC und GC/MS bewiesen wurde (Abschn. 5.5.), handelt es sich hierbei um die 3-Hydroxymyristinsäure,

b) Im Bereich von etwa 67-75 ppm sind wesentlich mehr Signale vorhanden, als auf Grund der C_β-Atome der Threonine zu erwarten sind. Wie in Abschn. 5.6. gezeigt wurde, stammen diese von der Glucose,

c) Das Signal bei 97.6 ppm entspricht dem anomeren Kohlenstoffatom der Glucose,

d) Die beiden Signale im Aromatenbereich bei 122.9 und 132.3 ppm stammen von einer α-β-Dehydroaminosäure (Δ Abu), vergleiche auch Abschn. 5.3.,

e) Bei 158.5 ppm erkennt man das charakteristische Signal des C_ζ -Atoms des Arginins (Guanidinogruppe),

f) Im Carbonylbereich sind wie zu erwarten elf Signale vorhanden.

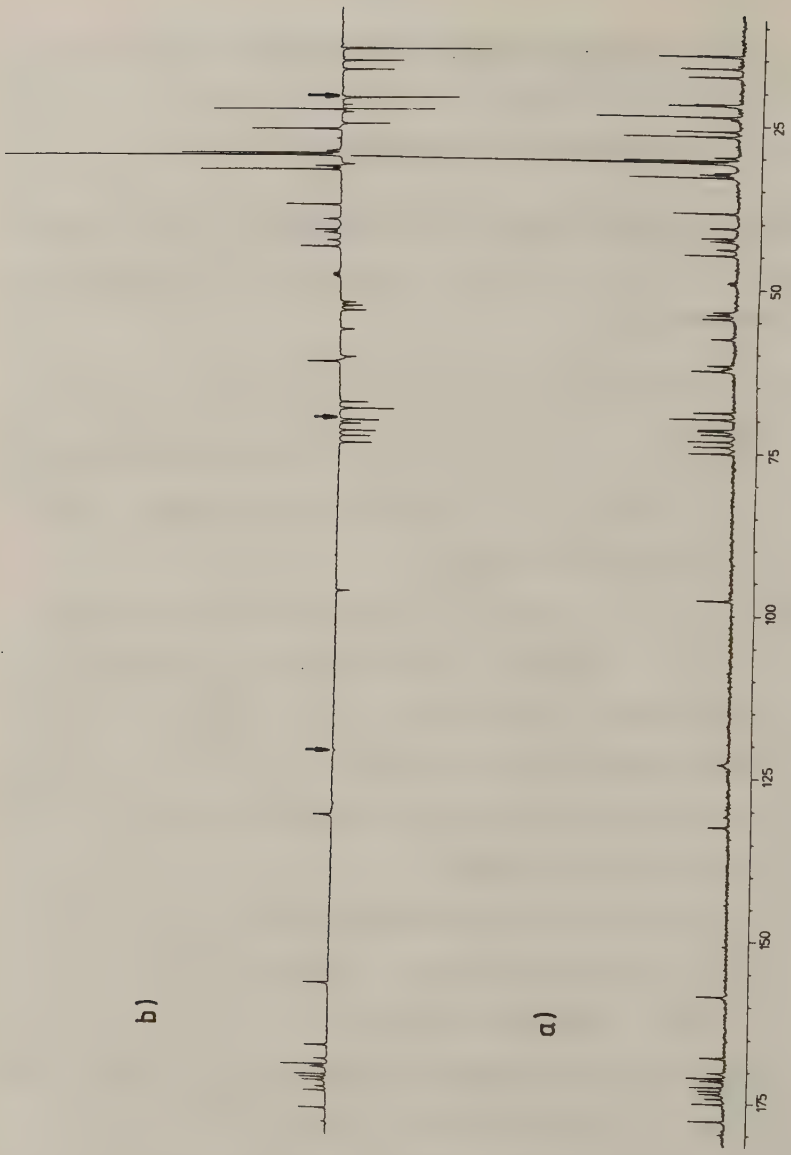


Abb. 26: ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A, in CD_3OD (ca. 200 mg/0.5 ml), ppm relativ TMS = 0, 100.6 MHz,
a) breitbandentkoppeltes Spektrum, 5768 scans
b) GASPE-Spektrum, 5978 scans

Ein wertvolles Hilfsmittel bei der Zuordnung der einzelnen Signale sind die J-modulierten Spin-Echo-^{13}C-NMR-Spektren. Dabei lassen sich die Signale primärer und tertiärer Kohlenstoffatome in die eine Richtung (in diesem Fall nach unten) und die sekundärer und quartärer in die andere Richtung (nach oben) schreiben. Vergleicht man das breitbandentkoppelte (Abb. 26a) und das Spin-Echo-^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 26b), so stellt man fest, daß in letzterem einige Signale nicht oder nur sehr schwach zu erkennen sind. Es sind die Signale bei 21.7, 62.4, 71.3 und 122.9 ppm. Als Ursache kommen unter anderem in Frage:

a) eine zu große Spin-Gitter-Relaxationszeit (T_1),

b) eine sterische Hinderung der freien Rotation und damit ein Temperatureffekt (Temperaturabhängigkeit der Signalbreite), oder

c) eine zu große C-H-Kopplungskonstante.

Welcher der einzelnen Effekte, ob einzeln oder mit anderen zusammen, vorliegt, konnte aufgrund des limitierten Zugangs zum NMR-Gerät nicht festgestellt werden.

In den Abb. 27 bis 30 sind die gespreizten ^{13}C-NMR-Spektren des Herbicolin A dargestellt. Das entsprechende Spin-Echo-Spektrum wurde teilweise mit abgebildet. Aus dem GASPE-Spektrum wird deutlich, daß bei 23.6 ppm ein CH_2- und ein CH_3-Signal zusammenfallen, die dem C-13 der 3-Hydroxymyristinsäure und dem $C_{\delta b}$ von Leucin entsprechen.

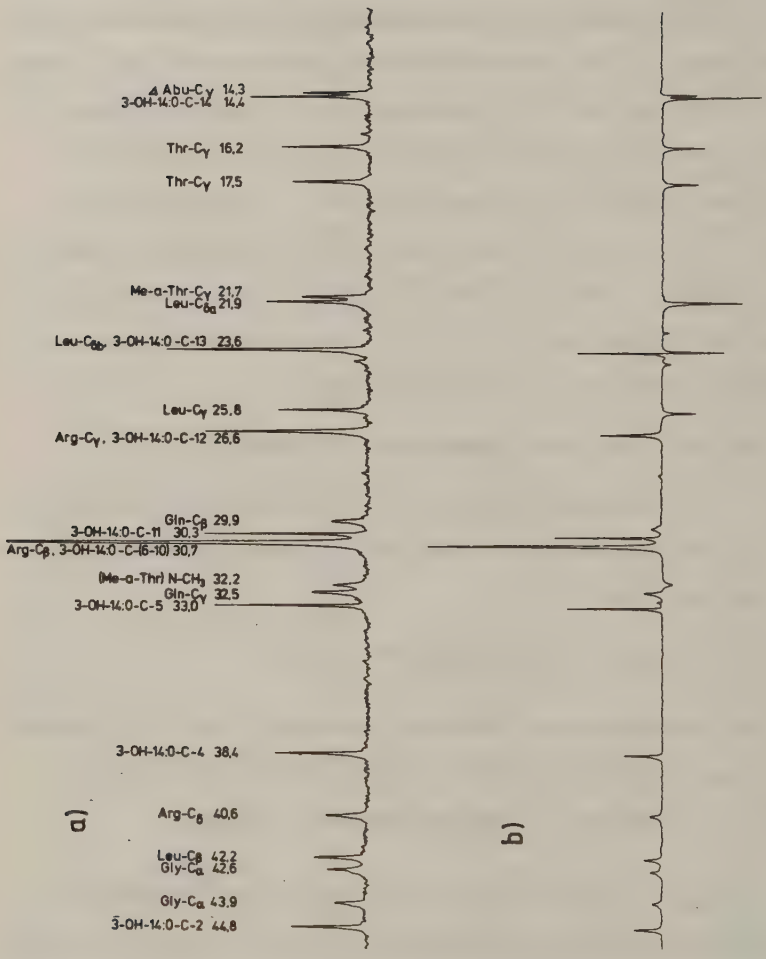


Abb. 27: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A

(Bedingungen wie Abb. 26)

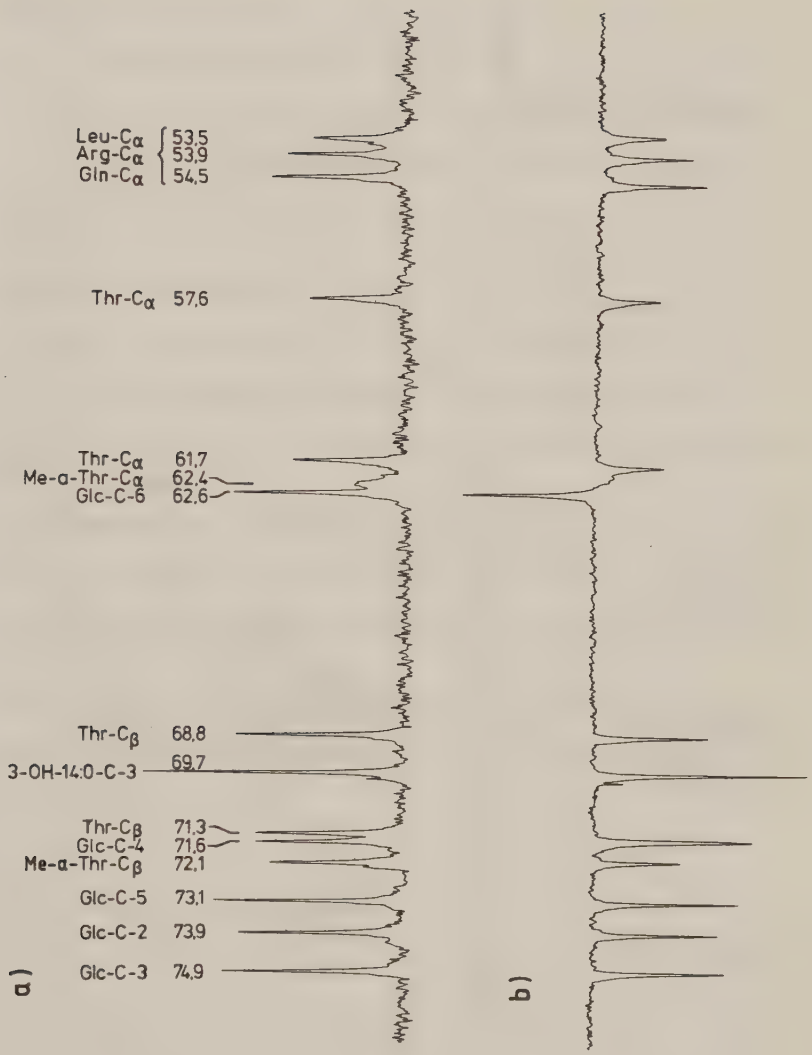
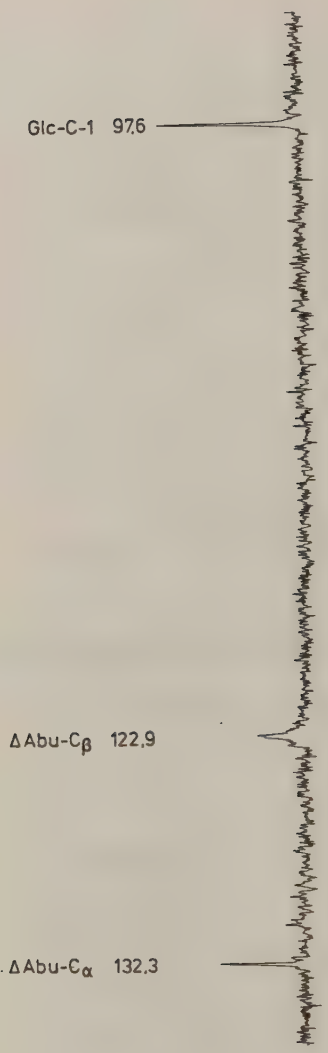


Abb. 28: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

(Sonstige Daten vergl. Abb. 26)



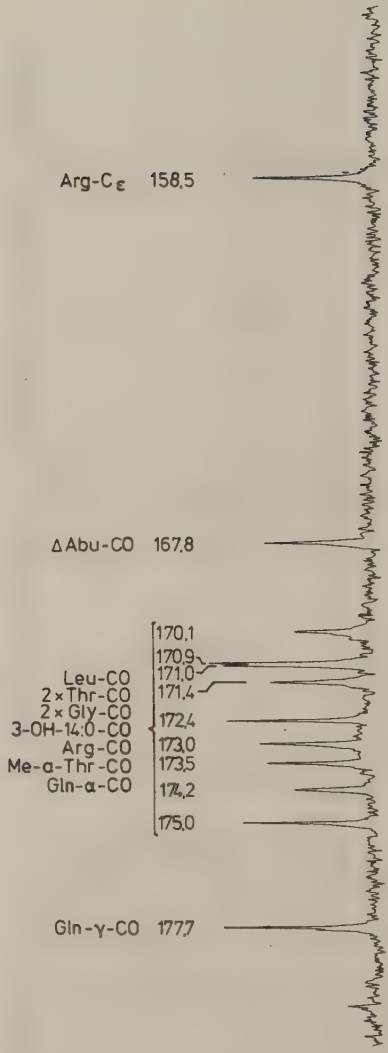


Abb. 29 (links): Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A, Aromatenbereich

Abb. 30 (rechts): Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Herbicolin A, Carbonylbereich; (sonstige Daten vgl. Abb. 26)

Ferner ist zu erkennen, daß das Signal bei 25.8 ppm vom C_γ des Leucins und nicht von einer CH_2-Gruppe stammt. Das CH_3-Signal bei 32.2 ppm ist dem N-CH_3 des N-Methyl-L-allo-Threonin zuzuordnen. Die C_α-Signale von Leucin, Arginin und Glutamin sind sehr gut getrennt, doch ist hier eine zweifelsfreie Zuordnung nicht möglich. Durch das Spin-Echo-Spektrum ist auch die Zuordnung des Signals möglich, welches dem C-6 der Glucose entspricht (62.6 ppm). Durch Vergleichsuntersuchungen konnte gezeigt werden (Abschn. 5.6.), daß im Herbicolin A die Glucose α-glycosidisch verknüpft ist.
Im Carbonylteil sind die erwarteten 11 Signale zu erkennen. Auf deren exakte Zuordnung wurde verzichtet, da der Aufwand dazu in keinem Verhältnis zur Aussagefähigkeit steht.

Die restlichen Signale ließen sich durch Vergleichsspektren und nach Literaturdaten (37-41) zuordnen (Tab. 6).

Tab. 6: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale (in ^{2}H-Methanol, δ (ppm))

Vergleichs-verbindungen		Herbi-colin A	H_2-Herbi-colin A	H_2-Herbi-colin-A-OMe	Herbi-colin A-säure
3-OH-14:0*					
C-2	43.2	44.8	44.4/44.6	44.1/44.3	44.7
C-3	69.3	69.7	69.8	69.6	69.9
C-4	38.1	38.4	38.3/38.4	38.1/38.2	38.4
C-5	33.0	33.0	32.9	32.8	33.0
C-(6-10)	30.7	30.7	30.6	30.5	30.7
C-11	30.4	30.3	30.3	30.2	30.4
C-12	26.6	26.6	26.5	26.4	26.6
C-13	23.6	23.6	23.6	23.4	23.7
C-14	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
ΔAbu (38)					
C_α	130.2	132.3			132.1
C_β	121.6	122.9			123.7
C_γ	14.4	14.3			13.7
Abu**					
C_α	58.6		56.4/57.1	56.2/56.9	
C_β	27.3		26.0/26.1	25.7/25.8	
C_γ	11.2		10.9/11.2	10.9/11.2	

Fortsetzung der Tabelle 6

2 x Thr (42)***						
	C_α	60.2	57.6	57.6/57.7	57.3/57.4	60.6
	bis	61.2	61.7	60.9/61.6	60.6/61.4	61.8
	C_β	68.1	68.8	68.6/68.9	68.4/68.8	68.2
	bis	69.0	71.3	70.4/70.7	70.0/70.3	68.2
	C_γ	19.8	16.2	15.9	15.7/15.8	15.8
	bis	19.9	17.5	16.8/17.2	16.8/17.1	20.3
Leu (42)***						
	C_α	53.8	nicht zugeordnet			
	C_β	40.8	42.2	42.0/42.1	41.8/41.9	42.2
	C_γ	25.4	25.8	25.8	25.5/25.6	25.8
	$C_{\delta a}$	22.2	21.9	21.8	21.7	21.7
	$C_{\delta b}$	23.1	23.6	23.6	23.5	23.6
2 x Gly (42)***						
	CH_2	43.4	42.6	42.6	42.3/42.3	42.4
			43.9	43.8/44.1	43.5/43.9	43.9
Gln (42)***						
	C_α	55.0	nicht zugeordnet			
	C_β	28.0	29.9	29.0/29.3	29.0/29.2	28.7
	C_γ	33.6	32.5	32.5/32.6	32.2/32.4	32.5

Fortsetzung der Tabelle 6

Vergleichs-verbindungen		Herbi-colin A	H_2-Herbi-colin A	H_2-Herbi-colin-A-OMe	Herbi-colin A-säure
Me-a-Thr					
C_α		62.4	63.0	62.4	60.6
C_β		72.1	72.3/72.9	71.9/72.6	70.4
C_γ		21.7	20.9/21.3	20.8/21.3	20.6
N-CH_3		32.1	32.6/32.8	32.8	32.3
Glucose****					
C-1	101.2	97.6	96.3/96.9	96.0/96.6	96.4
C-2	73.5	73.9	74.0/74.2	73.7/73.8	74.0
C-3	75.1	74.9	75.0	74.7	74.8
C-4	71.8	71.6	71.7	71.4	
C-5	73.5	73.1	73.1/73.2	72.9/73.7	73.5
C-6	62.7	62.6	62.6	62.4	
Arg (43)*****					
C_α	51.7	nicht zugeordnet			
C_β	29.5	30.7	29.6/30.1	29.5/29.9	30.7
C_γ	24.7	26.6	26.4/26.6	26.1/26.3	26.3

Fortsetzung der Tabelle 6

C_δ	40.3	40.6	40.5/40.7	40.2/40.4	41.0
C_ε	159.3	158.5	158.5	158.1	158.5
-O-Me				49.8	

---

* als Methylester, gemessen in CD_3OD; ** gemessen in D_2O, pD 9.5;

*** gemessen in D_2O; **** als Methyl-α-D-Glucopyranosid, gemessen in CD_3OD;

***** gemessen als N_ε -Nitro-Derivat in d-6-DMSO

6.2. ^{13}C-NMR-Spektrum des Dihydro-Herbicolin A

Die im Herbicolin A enthaltene Dehydroaminobuttersäure läßt sich, wie erwähnt, katalytisch zur α-Aminobuttersäure hydrieren. Im ^{13}C-NMR-Spektrum des Dihydro-Herbicolin A fehlen deshalb die beiden Signale der C=C-Doppelbindungen (Abb. 31). Die C_α- und C_β-Kohlenstoffe erscheinen statt dessen bei 26.0/26.1 (Abb. 32) und 56.4/57.1 ppm (Abb. 33). Außerdem ist ein CH_3-Signal von 14.3 nach 10.9/11.2 ppm hochfeldverschoben (Abb. 32).

Auffällig ist, daß fast alle Signale doppelt erscheinen (Abb. 32-34).
Da durch die katalytische Hydrierung D,L-Aminobuttersäure entsteht, ist Dihydro-Herbicolin A ein Diastereomerenpaar, was die Doppelsignale erklärt. Ferner tritt durch die Hydrierung eine, wenn auch vielleicht nur geringe, Konformationsänderung ein, die sich in einer Verschiebung der Signale bemerkbar machen kann (Tabelle 6). Das N-CH_3-Signal des Methyl-allo-Threonins fällt mit dem C_γ des Glutamins und dem C-5 der 3-Hydroxymyristinsäure zusammen und ist nur noch schwach als Schulter zu erkennen. Auch beim Dihydro-Herbicolin A wurde im Carbonylbereich auf eine Zuordnung verzichtet, zumal auch hier viele Signale verdoppelt sind (Abb. 34).

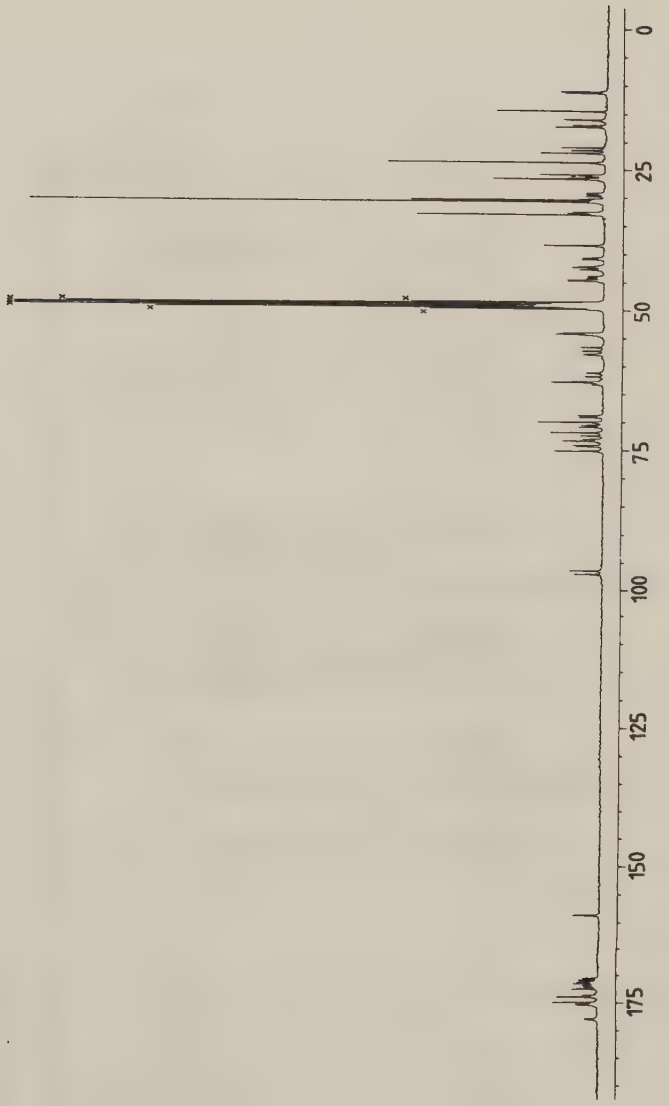


Abb. 31: ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin A, 70 mg/0.5 ml CD_3OD (x), (100.6 MHz, δ ppm relativ TMS = 0, 26.000 scans)

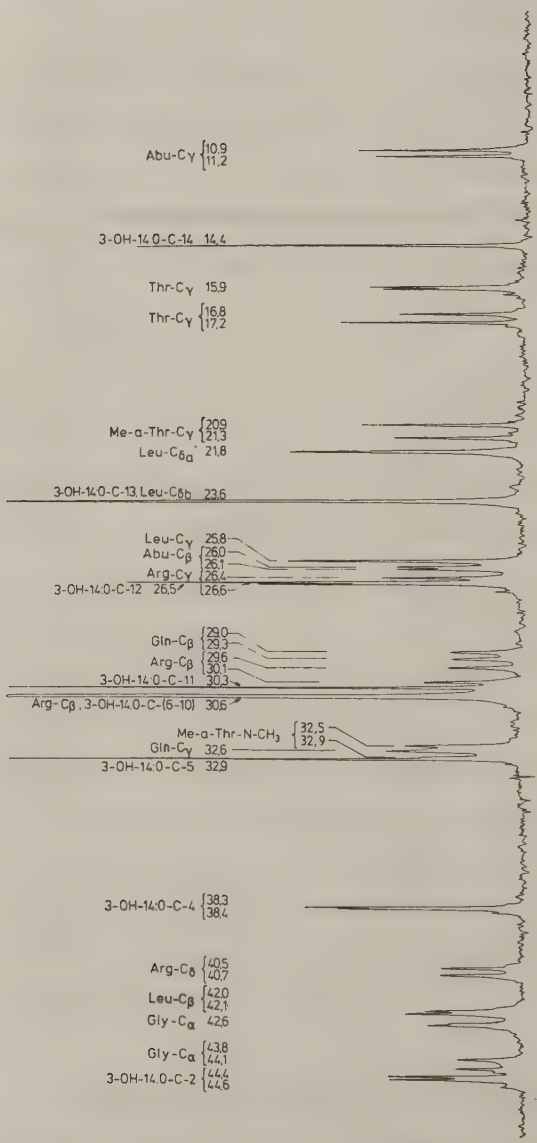


Abb. 32: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin A, sonstige Daten wie in Abb. 31

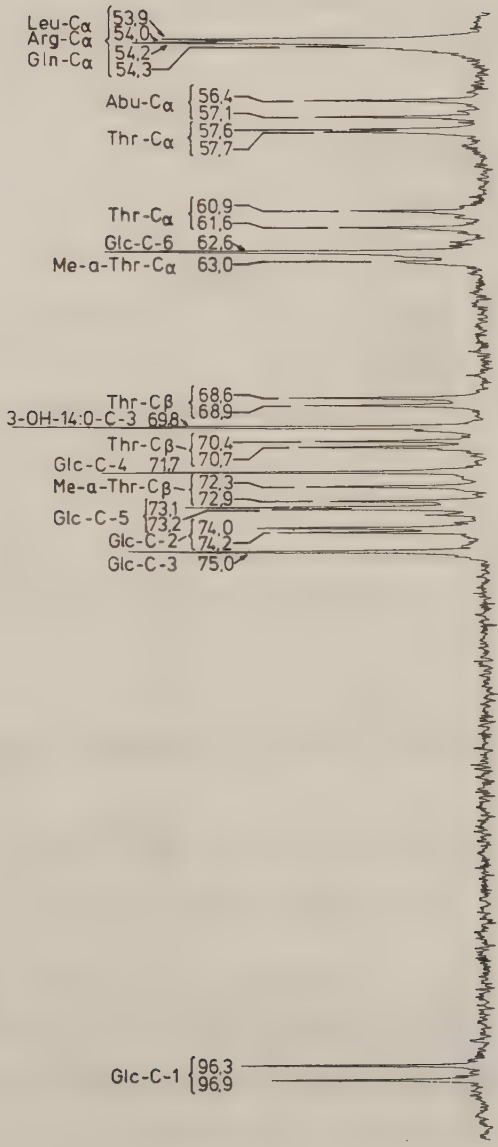


Abb. 33: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin A, sonstige Daten wie in Abb. 31

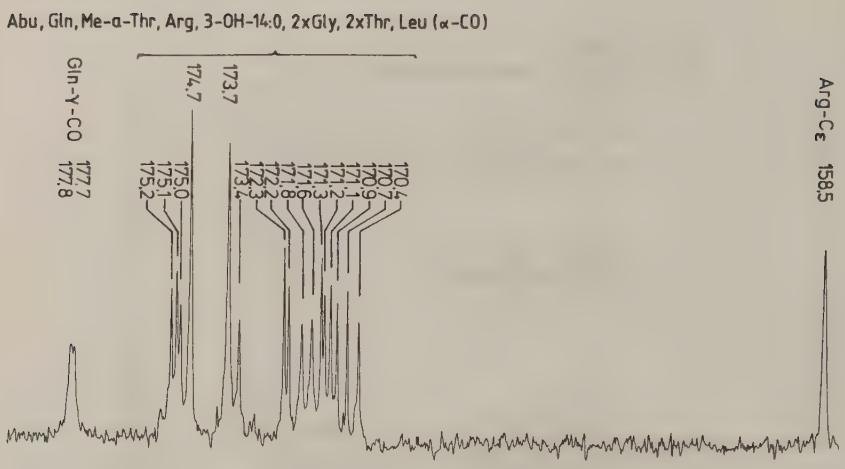


Abb. 34: ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin A, Carbonylbereich, sonstige Daten wie in Abb. 31

6.3. ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin-A-Methylester

Läßt man Dihydro-Herbicolin A einige Tage in Methanol stehen, so bildet sich daraus der Methylester (Abb. 35).

Mit Ausnahme des neu hinzugekommenen Methylsignals bei 49.8 ppm sind im ^{13}C-NMR-Spektrum keine wesentlichen Signalverschiebungen im Vergleich zum Dihydro-Herbicolin A zu erkennen (Abb. 37-39).

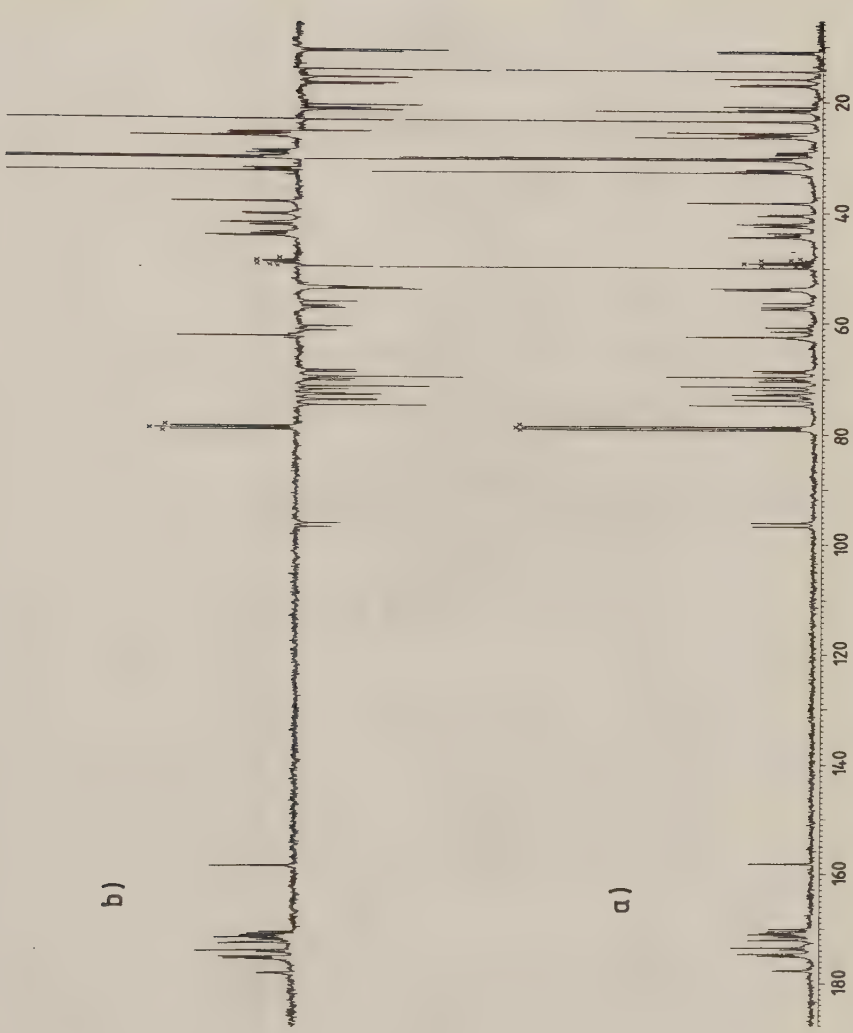


Abb. 35: ^{13}C-NMR-Gesamtspektrum von Dihydro-Herbicolin-A-methylester, gemessen in $CD_3OD/CDCl_3$ (x); 100.6 MHz; ppm relativ TMS = 0, ca. 70 mg/0.5 ml,

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum, 8160 scans

b) GASPE-Spektrum, 8160 scans

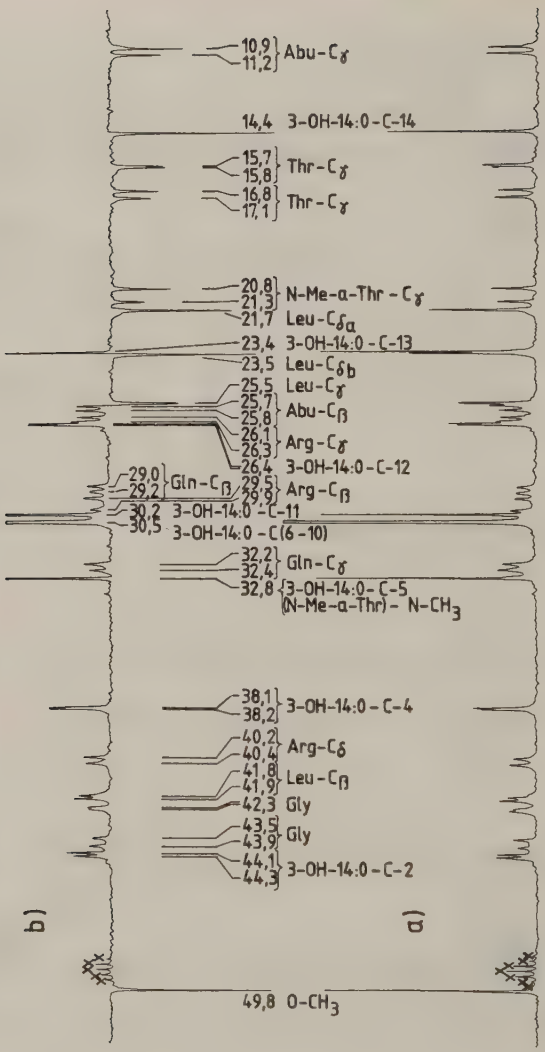


Abb. 36: ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin-A-methylester, gespreiztes Teilspektrum.

a) Breitbandenkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum (sonstige Daten wie bei Abb. 35)

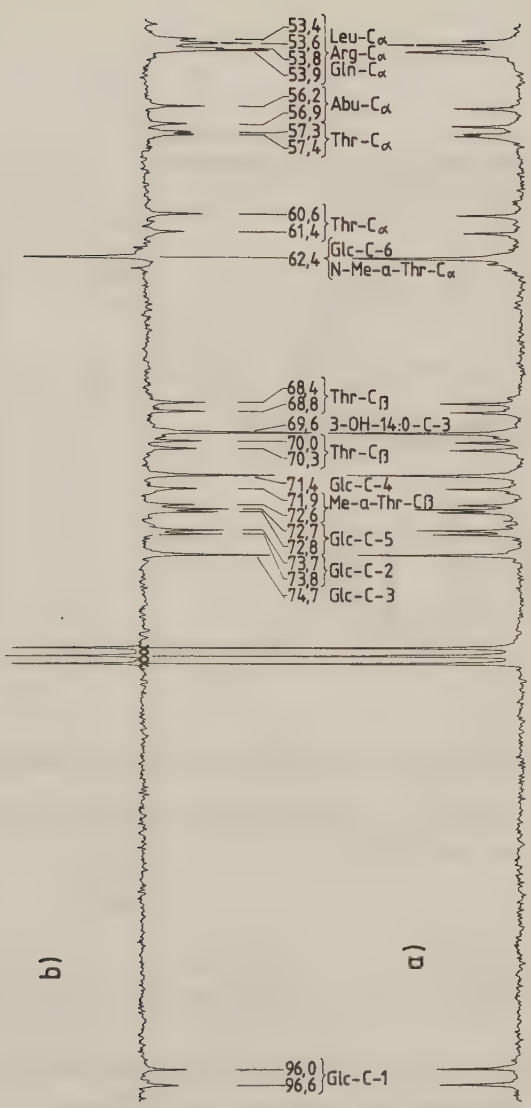


Abb. 37: ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin-A-methylester, gespreiztes Teilspektrum.

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum (sonstige Daten wie bei Abb. 35)

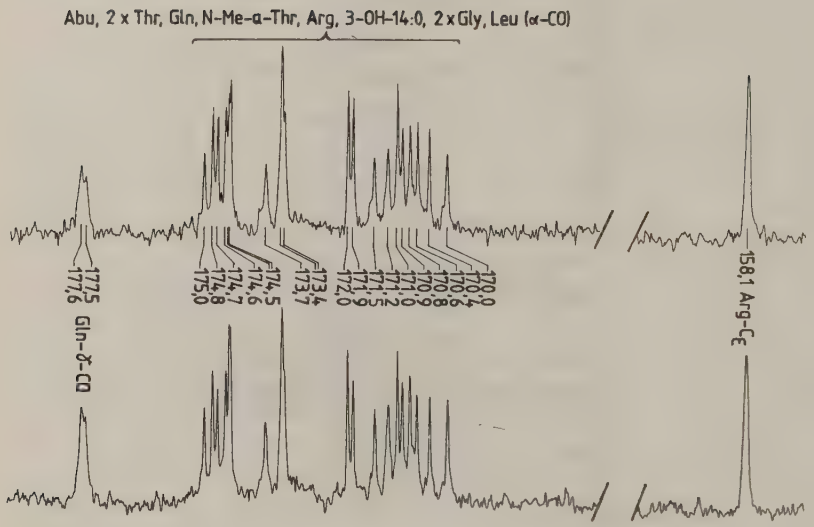


Abb. 38: ^{13}C-NMR-Spektrum von Dihydro-Herbicolin-A-methylester, gespreizter Carbonylbereich. Einzelheiten siehe bei Abb. 35

6.4. ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure (Na-salz)

Wird im Herbicolin A unter milden alkalischen Bedingungen der Lactonring geöffnet, so entsteht die Herbicolin-A-säure. Das Spektrum der Herbicolin-A-säure weicht in einigen Punkten stark von dem des Herbicolin A ab. Die

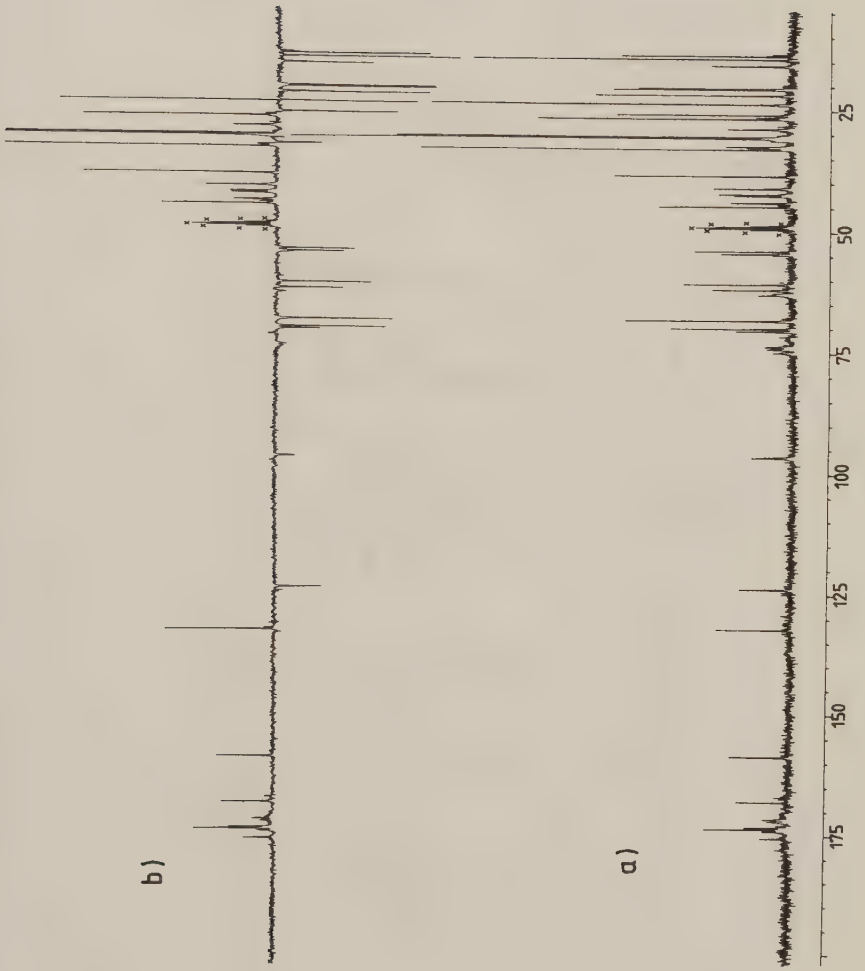


Abb. 39: ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure, ca. 100 mg/ 0.5 ml CD_3OD (x), (100.6 MHz, δ ppm relativ TMS = 0, 12.751 scans)

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

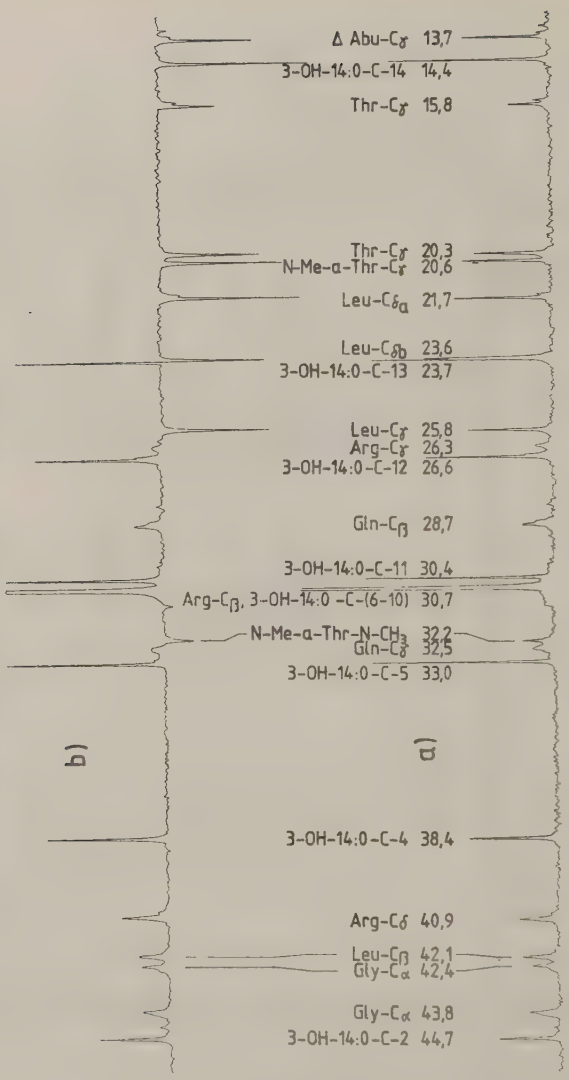


Abb. 40: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure, sonstige Daten wie in Abb. 39

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

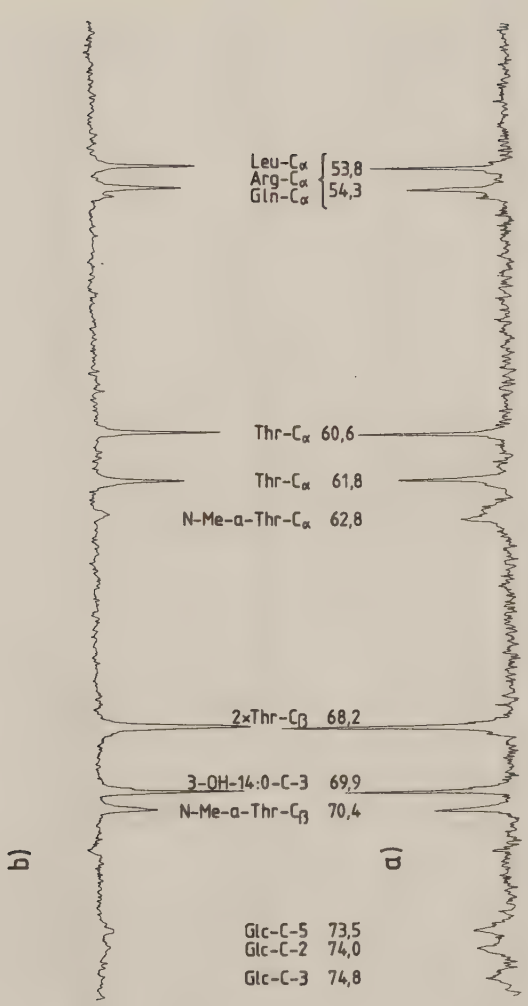


Abb. 41: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure, sonstige Daten wie in Abb. 39

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

Abb. 42: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure, sonstige Daten wie in Abb. 39

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

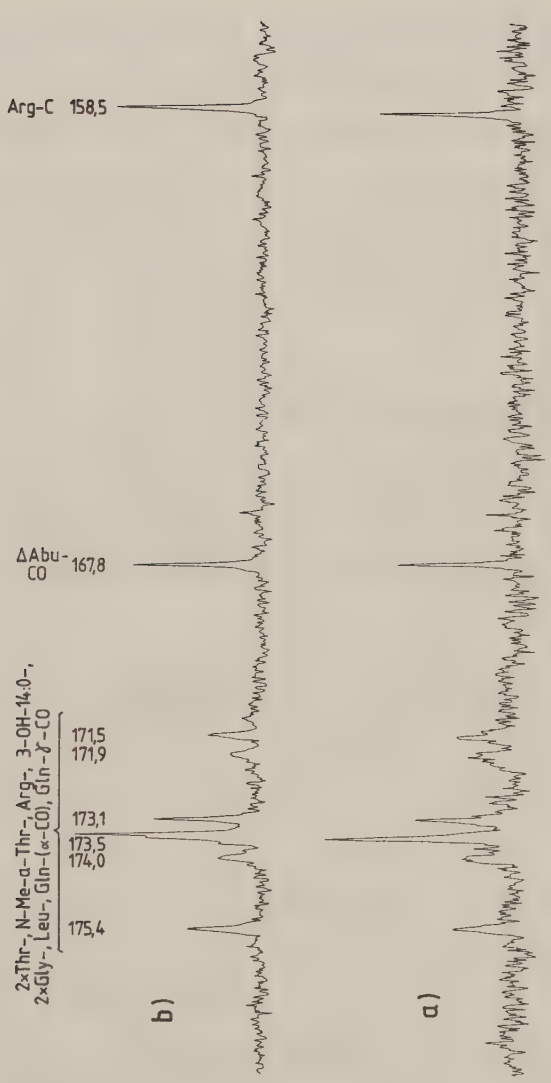


Abb. 43: Gespreiztes ^{13}C-NMR-Spektrum der Herbicolin-A-säure, Carbonylbereich, sonstige Daten wie in Abb. 39

a) Breitbandentkoppeltes Spektrum

b) GASPE-Spektrum

Signale der Threonine (L-Threonin, D-allo-Threonin und N-Methyl-L-allo-Threonin) sind größtenteils um bis zu 3 ppm verschoben (Tabelle 5). Ferner sind mit Ausnahme des anomeren Kohlenstoffs, alle Zuckersignale nur schwach oder im Falle der C-4 und C-6-Kohlenstoffe überhaupt nicht zu erkennen (Abb. 39 bis 43).

6.5. ^{1}H-NMR-Spektrum von Herbicolin A

Anhand von Literaturdaten (43-45) wurde die in Abb. 44 getroffene Zuordnung durchgeführt. Diese bedarf aber einer Absicherung durch zusätzliche NMR-Experimente.

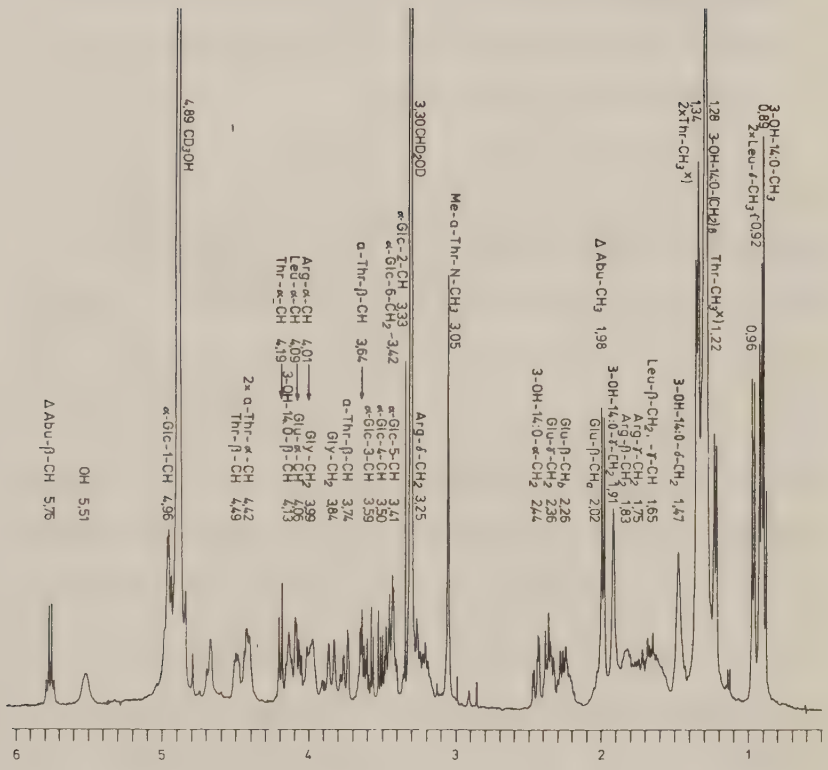


Abb. 44: ^{1}H-NMR-Spektrum von Herbicolin A, in CD_3OD (ca. 200 mg/0.5 ml), ppm relativ zu TMS = 0, 400.1 MHz, 107 scans.

* Eine Unterscheidung zwischen den CH_3-Signalen der verschiedenen Threonine war nicht möglich.

7. SEQUENZIERUNG

7.1. Strategie der Sequenzierung

Es war geplant, durch möglichst selektive Hydrolyse Peptid-Partialsequenzen präparativ zu isolieren, die dann mittels Edman-Abbau und parallel dazu durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie sequenziert werden sollten. Herbicolin A ist sehr empfindlich gegen verdünnte Säuren und Laugen. Trotzdem führten die unter milden Bedingungen erfolgten Hydrolysen nicht zu ninhydrinpositiven Spaltprodukten, welche Voraussetzung für einen Edman-Abbau sind. Offensichtlich werden hierbei nur die Glycosid- und Lactonbindung gespalten, oder das Reagenz addiert an die C=C-Doppelbindung der Dehydroaminosäure. Erst drastischere Hydrolysebedingungen ergaben Peptidfragmente, doch so viele, daß eine präparative Trennung auch durch HPLC nicht möglich war. Nur mittels Gaschromatographie war eine Trennung zu erwarten.

Versuche, durch enzymatische Spaltungen (mit Trypsin, Pepsin und Arg-spezifischer Protease aus Mäusedrüsen) Peptidfragmente zu erhalten, verliefen erwarungsgemäß negativ. Sicher liegt die Ursache im hohen D-Aminosäureanteil, wie auch bei anderen enzymresistenten Peptidantibiotika.

Aus diesen Gründen mußte der Plan, parallel mit beiden Verfahren (Edman-Abbau und GC/MS) die Sequenz zu erhalten,

fallen gelassen werden. Als einzige Methode zur Sequenzierung blieb die kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie.

7.2. Analytische Trennung von Partialsequenzen nach acidolytischer Spaltung

Wird Herbicolin A mit Methanol/konz. HCl erhitzt, so sind dünnschichtchromatographisch eine große Anzahl von Spaltprodukten nachweisbar, die auch mit Ninhydrin angefärbt werden können. In einem Vorversuch wurden dazu ca. 1 mg Herbicolin A eingesetzt. Auf Grund der Vielzahl an Komponenten war eine präparative Trennung, auch mit Hilfe der HPLC, nicht möglich. Deshalb wurden die verschiedenen Hauptbanden aus der Dünnschichtplatte ausgekratzt und auf ihre Aminosäurenzusammensetzung hin untersucht (Tab. 7). Wie aus der Tabelle 7 zu entnehmen ist, sind die einzelnen DC-Banden nicht sauber, obgleich bei einigen die Hauptkomponente überwiegt. Die Endgruppenbestimmung mittels Dansylchlorid zeigte ebenfalls, daß mehrere Peptide in diesen Hauptbanden enthalten sind. Da diese Methode sehr empfindlich ist, waren geringe Spuren deutlich zu erkennen. Trotz dieser Uneinheitlichkeit ließ sich abschätzen, welche Aminosäure N-terminal in der jeweiligen Hauptkomponente vorhanden ist. Eine weitere Reinigung der einzelnen DC-Banden brachte keine nenneswerte Änderung in der Aminosäurenzusammensetzung. Erschwert wurden weitere Reinigungen

Tab. 7: Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Hauptbanden im Dünnschichtchromatogramm, nach Acidolyse

Aminosäuren im Herbicolin A	Nr. der Banden im Dünnschichtchromatogramm (R_F-Werte im System I)									
	1 (0)	2 (0.14)	3 (0.23)	4 (0.29)	5 (0.36)	6 (0.47)	7 (0.63)	8 (0.72)	9 (0.82)	10 (0.96)
Thr 2	0.57	0.30	0.94	0.30	0.40	0.38	0.98	0.81	1.47	1.69
Glu 1	0.65	0.94	1.38	1.29	1.25	0.89	0.96	1.47	0.32	0.14
Gly 2	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00
Leu 1	0.63	0.34	0.88	0.35	0.45	0.33	0.83	0.69	1.10	1.28
Arg 1	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-

dadurch, daß bei diesem Vorversuch sehr wenig Substanz vorhanden war (ca. 1 mg Herbicolin A wurde hydrolysiert). Trotzdem konnte, mit gewissem Vorbehalt, folgende Verknüpfung vorgeschlagen werden. Die unterstrichenen Aminosäuren wurden bei der Endgruppenbestimmung als N-terminale Aminosäuren erkannt.

(10) Thr - (Thr, Leu) - Gly

(7)(3) (Thr, Leu) - Gly - (Glu, Gly)

(6)(2) Gly - (Glu, Gly)

Die Zahlen in Klammern geben die jeweiligen DC-Banden-Nummern wieder.

Zur weiteren Absicherung wäre ein Edman-Abbau von Vorteil gewesen. Auf Grund der Uneinheitlichkeit und wegen Substanzmangel mußte darauf verzichtet werden.

Um mehr Partialsequenzen zur Verfügung zu haben, wurden zwei weitere Hydrolyseversuche mit größeren Substanzmengen durchgeführt. Beide brachten nicht das gewünschte Ergebnis. Entweder waren derart viele ninhydrinpositive Spaltprodukte dünnschichtchromatographisch nachweisbar, daß selbst Auskratzen nicht mehr möglich war, oder es gab nur wenige mit Ninhydrin, jedoch sehr viele nur mit Chlor/TDM anfärbbare Flecken. Trennversuche mittels Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex führten zu keinem befriedigenden Ergebnis.

7.3. Spaltung von Herbicolin A mit Ammoniaklösung

Läßt man Herbicolin A in konz. Ammoniaklösung bei Zimmertemperatur über Nacht stehen, so erhält man unter anderem ein Produkt, welches eine freie Aminogruppe enthält. Durch Multiplikative Gegenstromverteilung lassen sich die Spaltprodukte größtenteils auftrennen (Abb. 45).

Das Peptid in den Fraktionen 6-15 enthält noch alle mittels Aminosäurenanalyse nachweisbaren Aminosäuren und die β-Hydroxymyristinsäure (gaschromatographisch bestimmt).

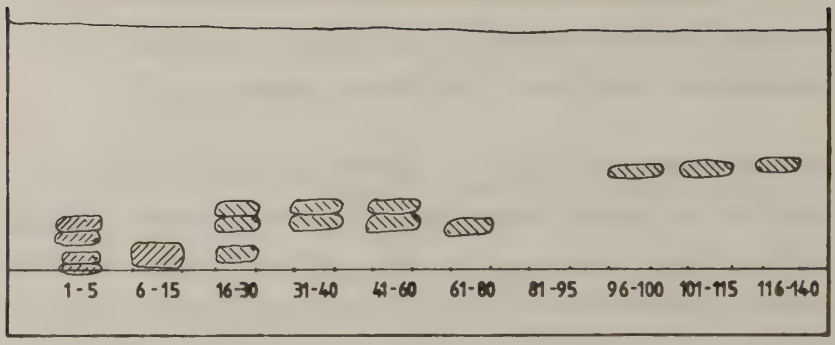


Abb. 45: Dünnschichtchromatogramm der vereinigten Fraktionen; DC-System I; Craig-Bedingungen (siehe Experimenteller Teil, Zeichenerklärung: (////) mit Ninhydrin und Chlor/TDM anfärbbar, (\\\\\) nur mit Chlor/TDM anfärbbar

Die Endgruppenanalyse mittels Dansylchlorid zeigte eindeutig, daß Arginin N-terminal gebunden ist. Auch der Edman-Abbau (46) bestätigte dies. Da PTH-Arginin im Gegensatz zu den anderen PTH-Aminosäuren nicht wie üblich durch Extraktion entfernt werden kann, wurde dieses durch Gelfiltration an Sephadex LH-20 abgetrennt. Aus dem Elutionsverhalten kann geschlossen werden, daß das Restpeptid fast unverändert groß ist, aber überraschenderweise keine freie Aminogruppe mehr besitzt, so daß kein weiterer Edman-Abbau mehr möglich war. Durch vergleichende Aminosäurenanalysen vor und nach diesem einen Edman-Abbau-Cyclus konnte

ebenfalls bestätigt werden, daß nur Arginin abgespalten wurde:

	Aminosäurenanalyse vor Edman-Abbau	Aminosäurenanalyse nach Edman-Abbau
Thr	2	2
Glu	1	1
Gly	2	2
Leu	1	1
Arg	1	0

Aufgrund dieser Beobachtungen kann Arginin nur mit einer der zahlreich vorhandenen Hydroxygruppen im Herbicolin A verestert vorliegen. Warum aber eine Peptidbindung unter so milden Bedingungen gespalten wird, kann nicht erklärt werden.

7.4 Sequenzierung von Herbicolin A durch GC/MS*

Die Sequenzierung von Herbicolin A mit kombinierter Gas-

---

* Herrn Prof. Dr. W.A. König und seinen Mitarbeitern (Universität Hamburg) danke ich recht herzlich für die in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchungen.

chromatographie/Massenspektrometrie wurde mit drei verschiedenen Derivatisierungsmethoden durchgeführt. Aus den nach Partialhydrolyse erhaltenen Fragmenten wurden folgende Derivate hergestellt:

a) Trimethylsilyl-Derivate

b) Trifluoracetyl-peptidmethylester

c) N-Ethyl-polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivate

Jede dieser drei Derivatisierungsmethoden besitzt gegenüber den anderen Vor- und Nachteile. Um möglichst viele Informationen zu erhalten, und um diese vergleichen und kombinieren zu können, wurden alle drei Verfahren angewandt (34). Bei den nach den Methoden a) und b) derivatisierten Partialhydrolysaten konnte keine Dehydroaminobuttersäure identifiziert werden. Deshalb wurde zuvor katalytisch hydriert und das so entstandene Dihydro-Herbicolin A hydrolysiert.

Die nach den verschiedenen Derivatisierungsmethoden erhaltenen und identifizierten Fragmente sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Ein argininenthaltendes Peptid konnte nicht gefunden werden. Sowohl bei der Isolierung und Aufarbeitung, als auch bei den in Abschnitt 7.2. und 7.3. durchgeführten Spaltungen, fiel die leichte Abspaltbarkeit des Arginins auf. Es war auch nicht möglich ein glukosehaltiges Fragment mittels GC/MS zu finden. Dies war zu erwarten, da die glycosidische Bindung unter diesen

Hydrolysebedingungen vollständig gespalten wird und zudem der größte Teil der Glucose zerstört wird.

Tab. 8: Fragmente, die mittels GC/MS identifiziert wurden. In Klammern sind die Methoden angegeben, nach der die Fragmente identifiziert wurden.

R-3-OH-14:0 - ΔAbu	(H_2/Pd-b)(c)
R-3-OH-14:0 - ΔAbu - L-Thr	(H_2/Pd-b)(c)
ΔAbu - L-Thr	(c)
L-Thr - D-a-Thr	(a)(c)
L-Thr - D-a-Thr - D-Leu	(b)(c)
L-Thr - D-a-Thr - D-Leu - Gly	(c)
D-a-Thr - D-Leu	(a)(b)(c)
D-a-Thr - D-Leu - Gly	(a)(c)
Gly - D-Glu	(a)(b)
D-Glu - Gly	(b)(c)
D-Glu - Gly - N-Me-a-Thr	(c)
Gly - N-Me-a-Thr	(a)

R-3-OH-14:0 - ΔAbu - L-Thr - D-a-Thr - D-Leu - Gly - D-Glu - Gly - N-Me-a-Thr

Um die Verknüpfung der Glucose zu bestimmen, wurde Herbicolin A perdeuteromethyliert, mild hydrolysiert und anschließend trimethylsilyliert. Mittels GC/MS wurde eindeutig 2,3,4,6-Tetra-O-deuteromethyl-1-O-trimethylsilylglucose nachgewiesen, was die glycosidische Verknüpfung über C-1 der Glucose beweist (vergl. Abschn. 5.6., Abb. 24).

Durch Oxidation mit Chromsäure (34) werden nur solche Hydroxy-Gruppen verändert, die frei vorliegen, veresterte bleiben dagegen unbeeinflußt. So wurde festgestellt, daß die Hydroxy-Funktionen der 3-Hydroxymyristinsäure und des

L-Threonin blockiert sein müssen. Über eine dieser beiden Gruppen wird also der Lactonring im Herbicolin A geschlossen.

Um die Acylkomponente der Lactongruppe zu bestimmen, wurde mit Natriumborhydrid reduziert. Esterartig verknüpfte Carboxy-Funktionen (auch in Lactonen) werden dabei zu Alkoholen reduziert, Amide bleiben dagegen unverändert. Da nach Reduktion mit Natriumborhydrid kein Arginin mehr in der Aminosäurenanalyse
Arginin vermutlich über L-Threonin den Lactonring.

Nach einem FAB-Massenspektrum (Abb. 46) besitzt Herbicolin A eine Masse von 1299 (Herbicolin B dagegen von 1168). Danach enthält Herbicolin A nicht nur einen Lactonring, sondern es muß eine Säureamidgruppe, statt einer freien Carboxyfunktion (als Gln) vorliegen.

Prof. König (Universität Hamburg) teilte während der Zusammenfassung dieser Arbeit mit, daß er inzwischen eindeutig ein Dipeptid N-Me-a-Thr-L-Arg identifizieren konnte.

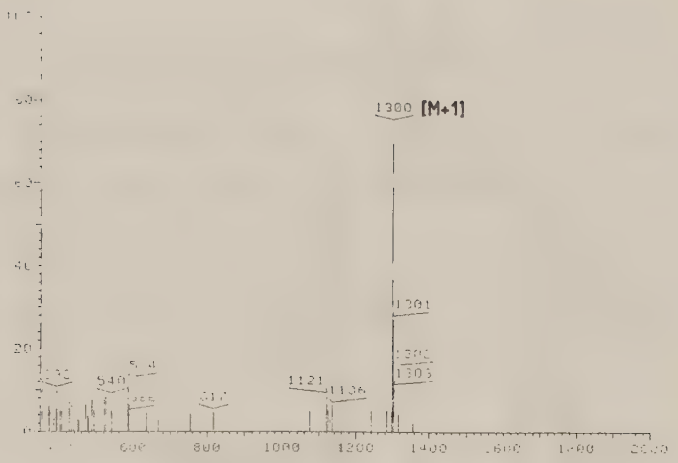


Abb. 46: FAB-MS von Herbicolin A

Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß Herbicolin A somit die in Abb. 47 gezeigte Konstitution besitzt.

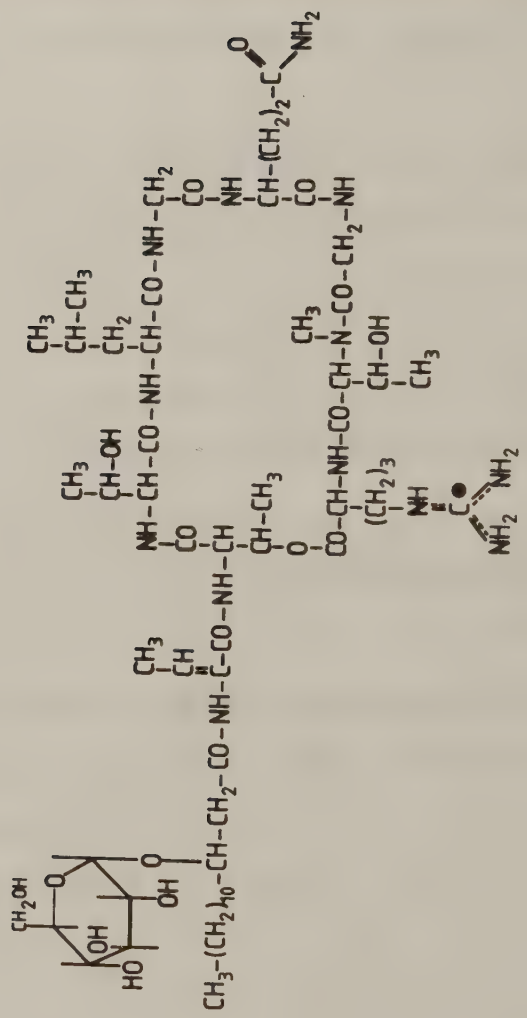
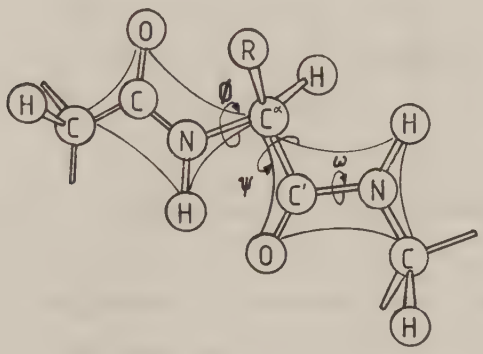


Abb. 47: Die Konstitution von Herbicolin A

8. DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR VON PEPTIDEN

8.1. Die verschiedenen Konformationen

Die mesomeriestabilisierte Peptidbindung ist aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters wesentlich kürzer (1.32 Å) als der normale C-N-Abstand (1.47 Å). Deshalb ist eine Rotation um diese Bindung auch stark gehindert, und die Atome der Peptidbindung liegen in einer Ebene.



Winkel nach IUPAC-Nomenklatur (47): ϕ = 0° für C_α-N trans zu C'-O, ψ = 0° für C_α-C' trans zu N-H, ω = 0° für C'-O cis zu N-H; hier sind alle Winkel jeweils 180°.

Bei den Peptiden sind deshalb Drehungen nur um die N-C_α-Bindung (ϕ) und die C_α-C'-Bindung (ψ) möglich. Ramachandran und Sasizekharan (48) berechneten mit Hilfe der van der Waals-Radien (Hartkugelmodell) die sterisch erlaubten ϕ/ψ-Winkelkombinationen (Abb. 48).

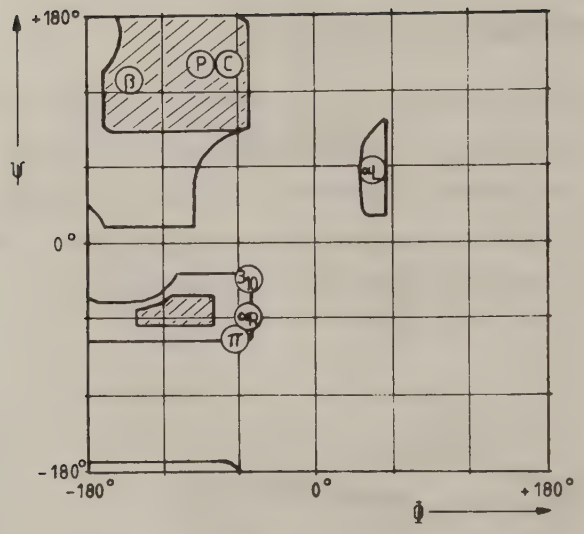


Abb. 48: Ramachandrandiagramm (vereinfacht, für L-Aminosäuren) mit bevorzugten (schraffiert), erlaubten und verbotenen Gebieten; α_R rechtsgängige und α_L linksgängige α-Helix, β antiparallele β-Struktur, C "Kollagenhelix", P Prolinhelix, 3_{10}-Helix und π-Helix; übernommen aus (49)

Danach sind vor allem zwei Bereiche begünstigt. Das ist zum einen der Helixbereich und zum anderen das Gebiet der β-Konformationen (wenn die Prolin- und Kollagenhelix als Sonderfälle nicht mit einbezogen werden). Eine geordnete Struktur liegt aber nur dann vor, wenn mehrere Aminosäuren

die gleichen ϕ/ψ-Winkelkombinationen einnehmen. Verteilen sich jedoch die Winkelpaare der einzelnen Aminosäuren eines Peptids über die verschiedenen erlaubten Bereiche im Ramachandran-Diagramm, so spricht man von ungeordneter oder Zufallstruktur (ϱ-Struktur, Randomcoil-Struktur) (50).

Eine etwas bessere Beurteilung der sterischen Hinderung, als es durch das Ramachandran-Diagramm möglich ist, erlaubt ein Potentialenergie-Diagramm (Abb. 49).

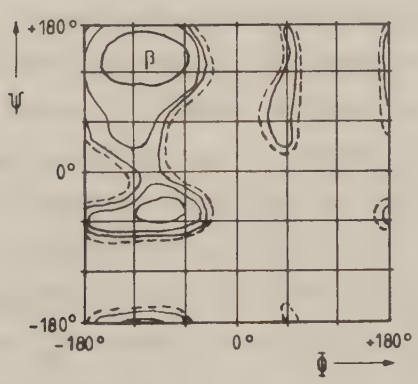


Abb. 49: Potentialenergie-Diagramm; durchgezogene Linien sind im Abstand von 1 kcal/mol, negativ zu Null (gestrichelt); übernommen aus (51)

Beide Diagramme sind zwar qualitativ sehr ähnlich, doch zeigt letzteres eine Brücke zwischen dem helikalen und

Konformation ist zu beachten, daß Ramachandran- und Potentialenergie-Diagramme immer nur die rein sterischen Effekte widerspiegeln. Konformationsstabilisierende oder -destabilisierende Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Dipol-Dipol-Effekte) sind dabei nicht berücksichtigt.

In Peptiden und Proteinen werden jedoch nicht nur die eben besprochenen Konformationen, sondern auch noch die sogenannten Reverse Turns beobachtet. Darunter versteht man die Zurückfaltung einer Peptidkette um etwa 180°. Diese von SMITH und PEASE (52) geprägte Bezeichnung soll in dieser Arbeit beibehalten werden. Da β-Turns in Proteinen die häufigste Art des Reverse Turns darstellen, werden beide Begriffe in der Literatur leider oft vermengt. Je nach der Größe des durch die Wasserstoffbrücke geschlossenen Rings unterscheidet man zwischen α-Turn (C^+_{13}), β-Turn (C^+_{10}), γ-Turn (C^+_7), δ-Turn (C^+_8) und ε-Turn (C^+_{11}). Von diesen sind β- und γ-Turns relativ gut untersucht (52-60), obwohl letzterer in Peptiden und Proteinen wesentlich seltener zu beobachten ist. Einfache geschützte Aminosäurederivate liegen in unpolaren Lösungsmitteln häufig als γ-Turn vor. Das Ramachandran-Diagramm für diese beiden Reverse Turns ist in Abb. 50 dargestellt. Zu be-

---

+ bedeutet Cyclus, tiefgesetzte Zahl gibt die Anzahl der Atome in diesem durch H-Brücke geschlossenen Ring an.

achten ist, daß je nachdem welche Winkelkombinationen die Aminosäuren in den Positionen 2 und 3 einnehmen, insgesamt 6 verschiedene β-Turn-Typen unterschieden werden (Tabelle 9).

Ebenso werden je nach den Vorzeichen der Winkel zwei verschiedene γ-Turns beobachtet (Tabelle 10).

Tab. 9: Unterschiede der verschiedenen β-Turn-Typen

Type	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	- 60	- 30	- 90	0
I'	60	30	90	0
II	- 60	120	80	0
II'	60	-120	- 80	0
III	- 60	- 30	- 60	- 30
III'	60	30	60	30

Tab. 10: Die Winkel bei den beiden γ-Turn-Typen

	ϕ	ψ	ω
γ-Turn	70 bis 85	-60 bis -70	180 bis 155
γ'-Turn	-70 bis -85	60 bis 70	180 bis -155

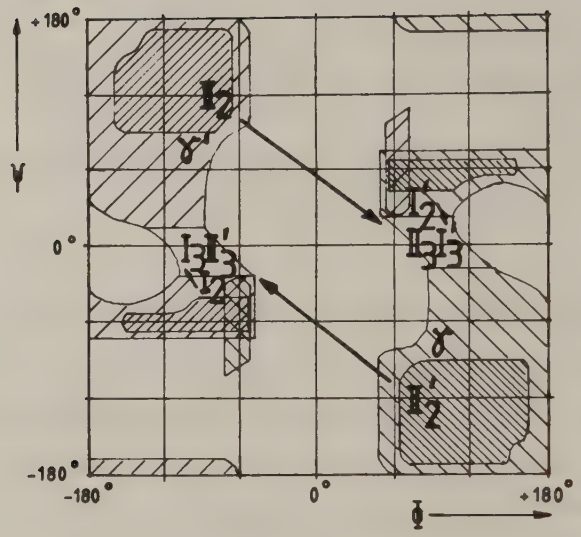


Abb. 50: Ramachandran-Diagramm von β- und γ-Turns. //// vollständig erlaubter Bereich (bevorzugt L-Aminosäuren). //// teilweise erlaubter Bereich (bevorzugt L-Aminosäuren), \\\\\ vollständig erlaubter Bereich (bevorzugt D-Aminosäuren), \\\\\\ teilweise erlaubter Bereich (bevorzugt D-Aminosäuren), I_2 β-Turn Typ I (Aminosäure 2), I_3, I_2', I_3' usw; beim β-Turn Typ III besitzen die Aminosäuren 2 und 3 die gleichen Winkelkombinationen wie sie für I_2 im Diagramm eingetragen ist, analoges gilt für III'.

Wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, muß in γ-Turns der Winkel nicht notwendigerweise 180° sein. Diese nicht ebene Peptidbindung ist wahrscheinlich charakteristisch für γ-Turns (52,53).

Vergleicht man das Ramachandran-Diagramm für Helices und β-Konformationen (Abb. 48) mit dem der Reverse Turns (Abb. 50), so erkennt man, daß Reverse Turns Winkelkombinationen aufweisen, die auch für β-Strukturen und α-Helix erlaubt sind. Die sterische Hinderung, einer Aminosäure ist ja gleich, ob sich daraus eine β-Konformation oder ein Reverse Turn ausbildet. Wie erwähnt, sind die ϕ/ψ-Winkelkombinationen innerhalb eines β-Turns nicht gleich, sondern von der Position innerhalb des Turns abhängig. Zu beachten ist hierbei, daß beim β-Turn Typ II die Aminosäure 2 (auch oft als i+1 bezeichnet) sowohl ϕ/ψ-Winkel von -60/120° (bevorzugt) als auch 60/60° (weniger bevorzugt) einnehmen kann, wenn andere Effekte dies begünstigen. Aus diesem Grunde ist es auch verständlich, daß es zum Teil sehr verschiedene CD-Spektren von β-Turns geben kann, da sich das Spektrum im Prinzip durch Linearkombination der Effekte, hervorgerufen durch die verschiedenen ϕ/ψ-Winkel, ergibt. Obwohl inzwischen von vielen Reverse Turns CD-Spektren veröffentlicht wurden (Übersicht in (52)) und theoretisch berechnete Spektren zur Verfügung stehen (Tab. 11), ist es nicht möglich aus dem Spektrum auf den Typ des Reverse-Turns zu schließen. So kann ein Spektrum der Klasse B von den β-Turn-Typen I, II und III

Tab. 11: Unterscheidung theoretisch berechneter CD-Spektren von Reverse Turns anhand ihrer Extremwerte (in nm)

Klasse*	$\lambda_{(max)}$	$\lambda_{(min)}$	$\lambda_{(max)}$	$\lambda_{(min)}$
A	-	190	195-200	210-220
B	-	190	200-210	220
C	180-195	200-210	-	215-225
D	190	190-200	210-220	225

* A', B', ... sind Spiegelbilder von A, B, ...

gebildet werden. Hinzu kommt, daß die beiden γ-Turn-Typen CD-Spektren ergeben müssen, die sowohl dem der β-Konformationen als auch dem des β-Turn-Typ II (bzw. II') ähnlich sein müssen, da deren Winkelkombinationen zum Teil sehr ähnlich sind. Aus diesen Gründen läßt sich bei Peptiden nur zwischen Helix, ungeordneter Struktur und β-ähnlicher Konformation unterscheiden, wobei unter dem letzten Betriff parallele und antiparallele β-Struktur und die verschiedenen Reverse Turns zusammengefaßt sind. Wenn ein Peptid in Lösung in verschiedenen im Gleichgewicht stehenden Konformationen vorkommt, oder wenn beispielsweise eine helikale Konformation überwiegt, dann ist es unmöglich aus dem CD-Spektrum den Typ eines Reverse Turns zu bestimmen.

Folgen nun mehrere Reverse Turns aufeinander, so können sich übergeordnete Strukturen ausbilden (wie z.B. Helices und Bänder). So ist bekannt, daß β-Turns des Typs III eine 3_{10}-Helix und γ-Turns eine $2,2_7$-Helix oder ein 2_7-Band bilden können. Leider sind von derartigen Helices oder Bändern keine Standard-CD-Spektren vorhanden. Lediglich im Bradykinin sind zwei γ-Turns so hintereinander, daß sie den Anfang eines 2_7-Bandes darstellen könnten (61). Ein CD-Spektrum eines derart kurzen 2_7-Bandes kann allerdings nur bedingt als Vergleichsspektrum herangezogen werden. Es mag sein, daß die Bandenlage noch einigermaßen für ein 2_7-Band charakteristisch ist, die Elliptizitätswerte sind aufgrund der fehlenden Überstruktur aber sicher kein zuverlässiges Kriterium.

8.2. Circulardichroismus der verschiedenen Konformationen

Chromophore, die sich in einem asymmetrischen Molekül befinden, lassen einfallendes linear polarisiertes Licht im Bereich der Absorptionsbande als elliptisch polarisiertes in Erscheinung treten. Als Maß für die Elliptizität, die sich aus dem Achsenverhältnis der Ellipse ergibt, wird der Thetawert ([Θ]) verwendet. Die Änderung von [Θ] in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als Circulardichroismus (CD) bezeichnet. Üblicherweise wird der gemessene Thetawert immer durch die Anzahl der im Molekül

enthaltenen Chromophore (bei Peptiden Anzahl der Aminosäuren) dividiert ($[\Theta]_M$ = mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest).
Das CD-Spektrum von Peptiden im fernen UV läßt sich auf die Elektronenanregung der Carbonyle von Amid-, Urethan-, Ester- und Carboxylgruppen zurückführen. Für die kurzwellige Absorptionsbande bei etwa 190 nm ist ein π,π^*-Übergang verantwortlich (62). Dagegen führt die Anregung von nichtbindenden Elektronen des Sauerstoffs zum π^*-Orbital (n,π^*) der Peptidbindung zu der etwas schwächeren Bande bei etwa 215 nm (63).

Die chiralen Aminosäuren sind ursächlich für die chiroptischen Eigenschaften der Peptide verantwortlich. Der weitaus größte Beitrag wird jedoch durch die räumliche Anordnung der Peptideinheiten hervorgerufen (64). Auch achirale Aminosäuren (wie z.B. Glycin oder α-Aminoisobuttersäure) müssen somit bei der Auswertung von CD-Spektren mit berücksichtigt werden.

Erfahrungsgemäß treten geordnete Strukturen bei Peptidlängen von 5 bis 12 Aminosäuren (je nach Konformationstyp) auf (64). Deshalb ist, wenn Herbicolin A eine geordnete Struktur besitzt, mit einem aussagefähigen CD-Spektrum zu rechnen.

Durch ein CD-Spektrum sind 3 Strukturtypen zu unterscheiden: Helix, β-Struktur und ungeordnete Struktur ($\wp$-Struktur) (Abb. 51).

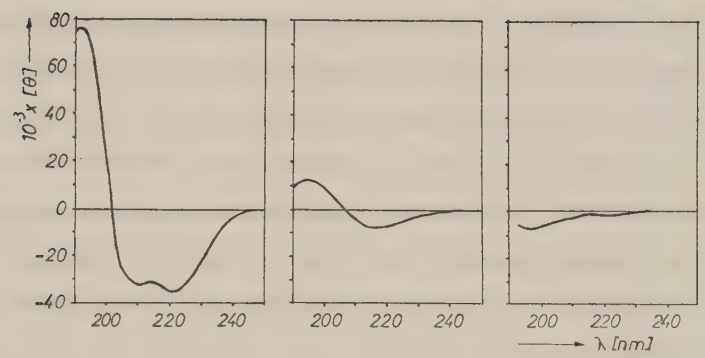


Abb. 51: CD-Spektren der Modellpolyaminosäuren;
a) α-Helix: Poly-L-Lysin in Wasser (pH 11.4) (65),
b) β-Struktur (antiparallel): Poly-L-Lysin in 1 % SDS (66),
c) $\mathcal{S}$ -Struktur: Poly-L-Serin in 8 M LiCl (67).

Es ist nicht einfach, zwischen den verschiedenen Konformationen zu unterscheiden, die innerhalb des gleichen ϕ/ψ-Winkelbereiches im Ramachandran-Diagramm vorkommen. So ist eine sichere Unterscheidung zwischen α- ($3,6^{+}_{13}$-) und 3^{+}_{10}-Helix mittels CD bis jetzt nicht möglich. Für Alamethicin wurde von mehreren Gruppen eine 3_{10}-Helix postuliert. Dagegen wurde von Jung und Mitarbeitern (68)

+ 3,6 bzw. 3 Aminosäure in einem durch H-Brücke geschlossenen Ring, bestehend aus 13 bzw. 10 Atomen.

auf Grund von systematischen CD-, IR- und NMR-Messungen, sowie durch die Bestimmung der Helixlänge aus Dipolmomentsmessungen schon früh für den N-Terminus von Alamethicin eine α-helikale Struktur bestimmt. Winter und Mitarbeiter (69) konnten an einer synthetisierten N-terminalen Modellsequenz des Alamethicins durch Röntgenstrukturanalyse dies eindeutig bestätigen. Auch zwischen den verschiedenen β-Strukturen kann bis jetzt mittels CD nicht sicher unterschieden werden.

Eine andere Schwierigkeit liegt in der Wahl der geeigneten Standardsubstanzen. So konnten LI und SPEKTOR (66) zeigen, daß Poly-L-Lysin (pH 11.5 und erhitzt auf 50°C), welches häufig als Modellsubstanz für die antiparallele β-Konformation diente, beträchtliche Mengen an α-Helix enthält. Eine derart uneinheitliche Konformation ist deshalb als Standard wenig geeignet.

8.3. Das CD-Spektrum von Herbicolin A

Durch Vergleich des Herbicolin-A-Spektrums (Abb. 52) mit den drei Standard-CD-Spektren (Abb. 51), läßt sich zeigen, daß es sich hierbei um eine der β-Struktur ähnliche Konformation handeln muß. Das Minimum des Spektrums von Herbicolin A ist allerdings gegenüber dem des Standardspektrums für die reine β-Konformation um 8-10 nm rotverschoben.

Schwierigkeiten bei der Auswertung eines CD-Spektrums machen zusätzlich Chromophore (71,76), da diese die Lage der Banden im CD-Spektrum verändern. Im Herbicolin A ist als zusätzlicher Chromophor nur die Doppelbindung der Dehydroaminobuttersäure enthalten. Diese könnte eine Rotverschiebung bewirken, jedoch sollte dies den π-π*-Übergang und wesentlich weniger den n-π*-Übergang beeinflußen (61). Eine Verschiebung des Minimums (n,π*-Übergang) um 8-10 nm durch nur eine zusätzliche Doppelbindung kann deshalb nicht dafür in Frage kommen. Somit sind konformative Effekte für die Rotverschiebung verantwortlich.

Am besten untersucht sind Verbindungen mit antiparalleler β-Faltblattstruktur, welche deshalb auch zur Berechnung des β-Konformationsanteils herangezogen werden (50,70,71). Die CD-Spektren der anderen möglichen β-Strukturen sind nach ROSENKRANZ und SCHOLTAN (50) ähnlich, doch quantitativ von der antiparallelen Konformation unterschiedlich. Hinzu kommt, daß je nach Vorbehandlung der β-Modellsubstanzen etwas andere CD-Spektren erhalten werden (50, 66,72-75). Für eine Auswertung werden aber exakt definierte und bezüglich ihrer Bezeichnung unterscheidbare Vergleichskonformationen benötigt.

Ein Strukturtyp, der ebenfalls ein Spektrum ergeben kann, welches dem der β-Konformation ähnlich ist, sind die Reverse Turns. Einer Art dieser Turns, den β-Turns, kommt immer mehr Bedeutung zu, da bei einer Auswertung von

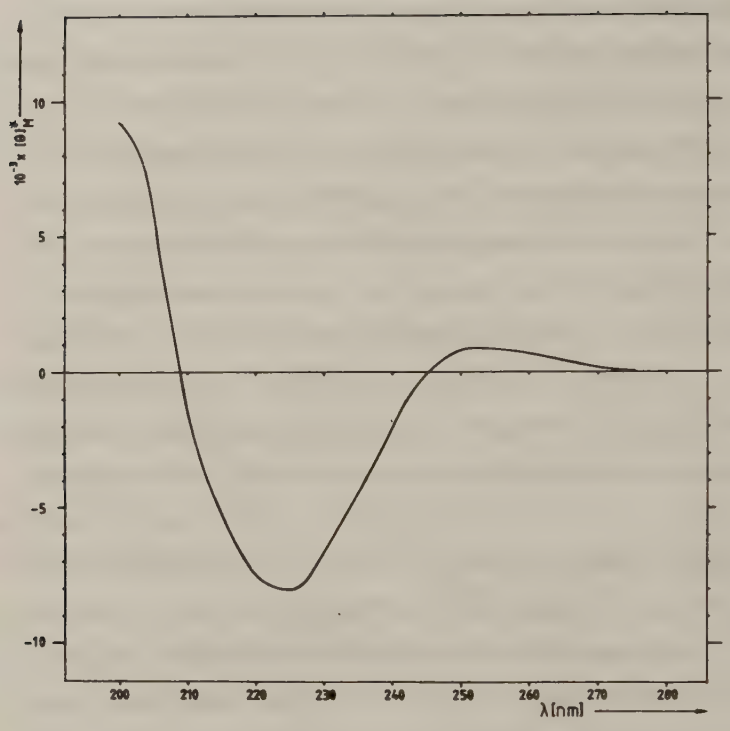


Abb. 52: CD-Spektrum von Herbicolin A; (c = 3.225 mg/ml Methanol; Schichtdicke: 0.1 mm; Temperatur: 22°C)
* [Grad x cm^2 x $dmol^{-1}$]

Röntgenstrukturdaten verschiedener Proteine etwa 30 Prozent der darin enthaltenen Aminosäuren in β-Turn-Gebieten gefunden werden. WOODY (77) hat mit Hilfe theoretischer Studien festgestellt, daß β-Turns vier verschiedene Klassen von CD-Spektren ergeben müssen, wobei aus den Spektren leider nicht auf den Typ des β-Turns geschlossen werden

kann (vergl. Abschnitt 8.2.). Einige dieser β-Turn-Spektren sind demjenigen der β-Konformation sehr ähnlich.

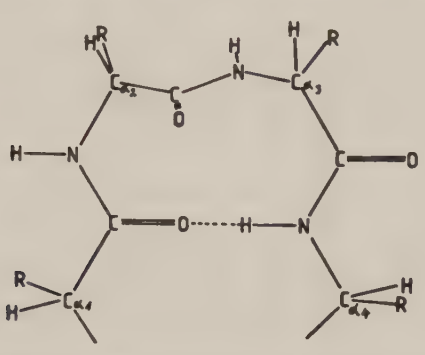


Abb. 53: Schematische Darstellung eines β-Turns mit darin enthaltener Wasserstoffbrückenbindung. Dieser Turn kann (als Typ III) Teil einer 3_{10}-Helix sein

Von BRAHMS und Mitarbeitern (78) wurde Poly-(L-Ala_2-Gly_2) (β-Turn Typ II) und von KAWAI und FASMAN (79) wurde Z-Gly-L-Ser(OBut)-L-Ser-Gly-O-Stearylester (β-Turn Typ I) als Modellsubstanzen für β-Turns vorgeschlagen. Die charakteristischen CD-Daten dieser beiden Peptide, sowie die von WOODY berechneten Werte (52,77) (vergl. auch Abschnitt 8.1.), werden in Tabelle 12 denen von Herbicolin A gegenübergestellt. Zusätzlich wurden die beiden β-Konformationen, die als β-I bzw. als β-II bezeichnet werden, in die Gegenüberstellung mit aufgenommen.

Tab. 12: CD-Daten von Herbicolin A und β-Turn-Modellpeptiden, von berechneten β-Turn-Spektren, sowie von β-I- und β-II-Konformationen

Verbindung bzw. Konformation	λ_1 [nm]	$[\Theta]_1$ [°xcm^{2}xdmol^{-1}]	O-Durchgang [nm]	λ_2 [nm]	$[\Theta]_2$ [°xcm^{2}xdmol^{-1}]	$\frac{[\Theta]_1}{[\Theta]_2}$
Herbicolin A*	<200	>+ 9 300	208	225	- 8 030	ca.1.2-1.6
β-Turn Typ II (78) Poly(L-Ala$_2$-Gly$_2$)	207.5	+ 63 200	221	277	- 5 200	12.1
β-Turn Typ I (79) Z-Gly-L-Ser(OBut)-L-Ser-Gly-O-Stearylester	198	+ 71 900	213	221	- 7 800	8.9
β-Turn (theor.) (77) Klasse-A-Spektrum	195-200	+ 13 000	210	210-220	- 5 700	2.3
β-Turn (theor.) (77) Klasse-B-Spektrum	200-210	+ 30 000	215-220	220-230	- 5 000	6.0
β-Turn (theor.) (77) Klasse-C-Spektrum	190-200	+ 13 000	200	210	- 10 000	1.3
β-Turn (theor.) (77) Klasse-D-Spektrum	180-200	- 10 000	205	210	+ 5 000	2.0

Fortsetzung der Tabelle 12

Verbindung bzw. Konformation	λ_1 [nm]	$[\Theta]_1$ [°xcm^{2}xdmol^{-1}]	O-Durchgang [nm]	λ_2 [nm]	$[\Theta]_2$ [°xcm^{2}xdmol^{-1}]	$\frac{[\Theta]_1}{[\Theta]_2}$
β-I-Konformat. (65) Poly-L-Lys (pH = 11.2)	195	+ 33 000	206	216.5	- 16 800	1.9
β-II-Konformat. (80) Poly-L-Cys(S-CH_2-COOH)	200	+ 38 000	215	225	- 8 500	4.4

* Da das Maximum des positiven Cotton-Effektes unter 200 nm liegt, war dieses aus apparativen Gründen nicht zu erfassen.

Obwohl die beiden β-Turn-Modellpeptide sich im CD-Spektrum unterscheiden, haben beide ein großes $[\Theta]_1/[\Theta]_2$-Verhältnis gemeinsam, woraus BRAHMS (78) den Schluß zog, daß dies charakteristisch für β-Turns sein könnte. SMITH und PEASE (52) haben in ihrem Übersichtsartikel viele CD-Daten von Peptiden einander gegenübergestellt, welche Reverse Turns enthalten. Dabei schwanken die Werte für das $[\Theta]_1/[\Theta]_2$-Verhältnis von 0.5 bis über 10. Da viele dieser Peptide noch andere Strukturelemente enthalten oder enthalten können, muß dies nicht unbedingt im Widerspruch zu der von BRAHMS gemachten Vermutung sein.

Da schon früher bei einigen CD-Spektren für β-Konformation eine Rotverschiebung beobachtet wurde, unterteilten FASMAN und Mitarbeiter (80,81) diese Spektren rein phänomenologisch in die beiden Gruppen β-I-Konformation (z.B. Poly-L-Lys, pH 11.2) (65,80) mit Banden bei 195-200 nm (+) und 210-220 nm (-) und β-II (z.B. Poly-Cys($S-CH_2-COO$), pH 4.42) (80) mit Banden bei 200 nm (+) und >220 nm (-). Da im Herbicolin A auch eine β-II-Konformation vorliegen könnte, wurden deren CD-Daten mit in Tabelle 1 aufgenommen. Worin sich diese beiden Typen jedoch bezüglich ihrer exakten Struktur unterscheiden, konnte bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden (81), da für beide eine antiparallele β-Struktur angenommen wird. Doch die verschiedenen Arbeitsgruppen ziehen unterschiedliche Schlüsse, ob die Wasserstoffbrücken intermolekular oder intramolekular vorliegen (81,82). Da eine intramolekulare antiparallele

β-Konformation (β-II-Struktur) durch Zurückfaltung der Peptidkette über einen Reverse Turn entstehen kann, müssen diese beiden Strukturvorschläge von WOODY (77) (β-Turn) und FASMAN (79,81) (antiparallele β-Konformation) nicht unbedingt im Widerspruch zu einander stehen.

Anhand der CD-Bandenlagen im Herbicolin A kann eine Beteiligung von β-Turns nicht ausgeschlossen werden. Andererseits zeigen die Intensitätsverhältnisse der Banden bei ca. 200 und 225 nm, daß β-Turns das CD-Spektrum wohl nicht bestimmen. Dies gilt unter der Voraussetzung, daß ein großes Verhältnis der Bandenintensitäten charakteristisch für β-Turns ist (Annahme von BRAHMS (78)). Vermutlich liegt auch keine der als β-I und β-II bezeichneten Konformationen vor. Gegen die β-I-Konformation spricht die mit Herbicolin A nicht übereinstimmende Bandenlage und gegen β-II das Intensitätsverhältnis der beiden Banden.

Bisher wurden als einzige Reverse-Turn-Art die β-Turns betrachtet, doch auch die γ-Turns kommen als mögliche Konformation in Frage. Die Dehydroaminobuttersäure legt die Winkel ϕ und ψ auf jeweils nur 0 oder 180° fest (Abb. 54). Aus sterischen und elektrostatischen Gründen sollte die Ano dnung in Abb. 53a begünstigt sein. Dies ist aber ein in die Ebene gedrängter γ-Turn. Folgen mehrere γ-Turns aufeinander, so kann sich entweder eine $2,2_7$-Helix oder ein 2_7-Band ausbilden.

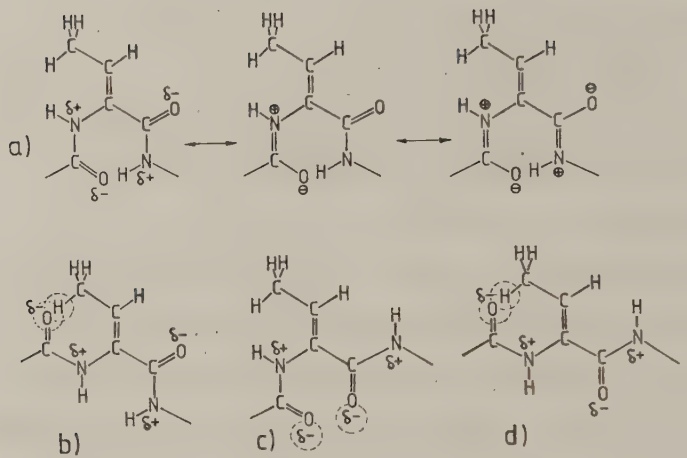
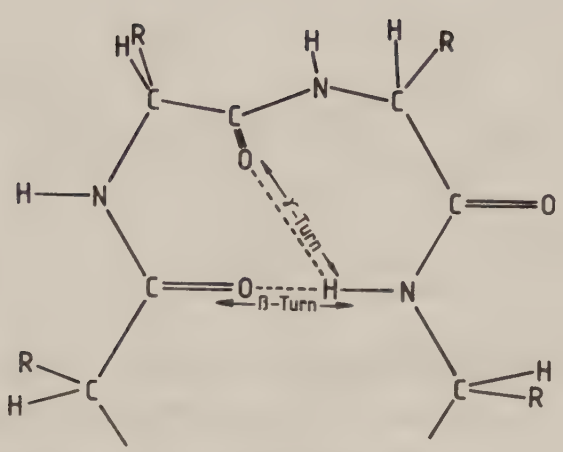


Abb. 54: Mögliche Anordnungen der Peptidbindungen bei ΔAbu; die mesomeren Grenzformen sind bei b-d analog a;
a) ϕ, $\psi = 0°$, b) $\phi = 180°$, $\psi = 0°$, c) $\phi = 0°$, $\psi = 180°$, d) ϕ, $\psi = 180°$

Die CD-Spektren der γ-Turns sind denen der β-Konformationen sehr ähnlich (Tabelle 11 und 12), da 1. man aufgrund der ϕ/ψ-Winkel sich im bzw. am erlaubten β-Strukturbereich (Ramachandran-Diagramm, Abb. 48) befindet und 2. γ-Turns sozusagen eine Verkleinerung des β-Turns darstellen:



CANN, STEWART und MATSUEDA (61) konnten durch sehr umfangreiche CD-Untersuchungen zeigen, daß im Bradykinin in unpolaren Lösungsmitteln teilweise die Konformation des 2_7-Bandes vorliegt (Abb. 55). Da einerseits diese im Gleichgewicht mit anderen steht und andererseits der Aromat des Phenylalanin sich störend im Spektrum bemerkbar macht, mußten Differenzspektren zur Interpretation herangezogen werden (Abb. 56).

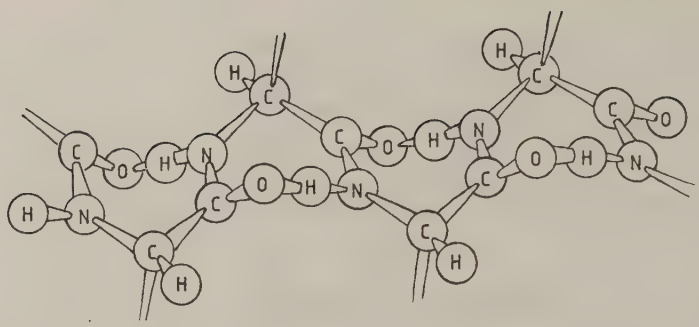


Abb. 55: Das 2_7-Band, Teilausschnitt. Der Winkel für die trans-Peptidbindung muß nicht 180° sein, sondern kann um bis zu 30° abweichen; ebenfalls muß die Wasserstoffbrückenbindung (O-H-N) nicht linear sein

Danach enthält Bradykinin insgesamt drei γ-Turns, wobei zwei so angeordnet sind, daß sie den Anfang eines 2_7-Bandes bilden können (Abb. 57).

Wenn dieses Differenz-CD-Spektrum der Sequenz Ser-Pro-Phe-Arg (Abb. 55) typisch für das 2_7-Band ist, dann enthält Herbicolin A mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls einen solchen Konformationsanteil. Bis auf die Bandenintensitäten stimmen beide Spektren überein (siehe auch Tabelle 13).

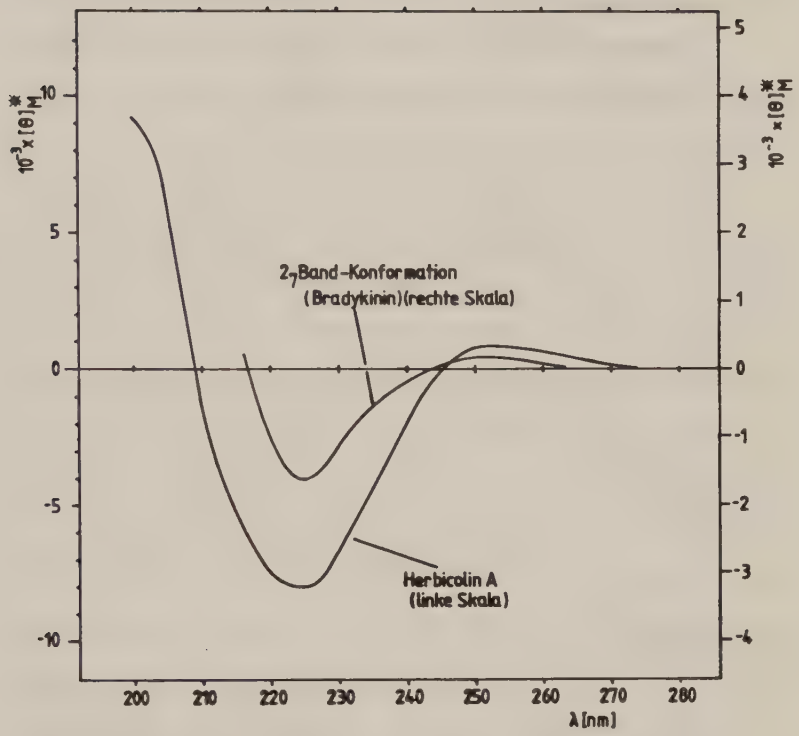


Abb. 56: Differenz-CD-Spektrum eines 2_7-Bandes von Bradykinin (61), sowie das von Herbicolin A,
*[Grad x cm^2 x $dmol^{-1}$]

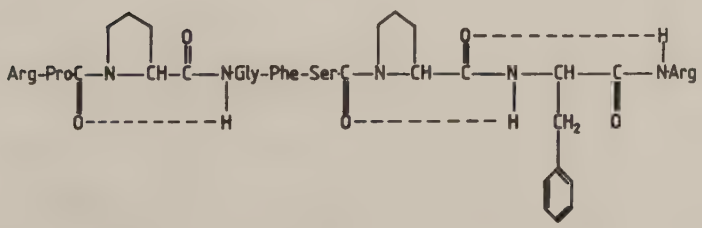


Abb. 57: H-Brückenbindungsschema von Bradykinin (61)

Tab. 13: Charakteristische CD-Daten von Herbicolin A, der Bradykininteilsequenz Ser-Pro-Phe-Arg (Differenzspektrum) und von verschiedenen γ-Turns

	λ_1*	[θ]** $\times 10^{-3}$	[θ] = 0*	λ_2*	[θ]** $\times 10^{-3}$	[θ]* = 0	λ_3*
Herbicolin A	252	+0.88	246	225	-8.03	209	<200
Ser-Pro-Phe-Arg (61)	250	+0.1	243	225	-1.6	ca.217	215
γ-Turn (C_6H_{12}) Ac-Pro-$NHCH_3$ (52)				227	-42		192
γ-Turn ($(CHCl)_2$) Ac-Ala-$NHCH_3$ (52)				220	-13		n.b.

* Dimension nm, ** Dimension Grad x cm^2 x $dmol^{-1}$

Auffallend bei beiden Spektren ist der schwach positive Cotton-Effekt bei 250 nm, der sonst in keinem Spektrum zu beobachten ist. Es wäre möglich, daß diese Bande charakteristisch für das 2_7-Band ist. Ursache dafür könnte sein, daß sowohl der Winkel für die trans-Peptidbindung als auch der Winkel für die Wasserstoffbrückenbindung nicht 180^o sein müssen. Der γ-Turn und damit zwangsläufig das 2_7-Band ist die einzige Konformation, bei der derartige Abweichungen beobachtet werden.

Wie oben erwähnt, stimmen die Bandenlagen sehr gut, die Intensitäten jedoch weniger gut überein. Nach CANN, STEWART und MATSUEDA (61) sind die Elliptizitäten nicht additiv. Erstens können bei der Differenzbildung ungenaue Werte erhalten werden. Zweitens ist bei einem längeren 2_7-Band (nicht nur zwei γ-Turns) eine stärker ausgeprägte Überstruktur vorhanden, so daß eine erhebliche Steigerung der Thetawerte erreicht werden kann. Dies bedeutet, daß im Herbicolin A mehr als 2 γ-Turns in der Form eines 2_7-Bandes vorhanden sein müssen, denn Herbicolin A ergibt im CD-Spektrum Elliptizitäten, die etwa um den Faktor fünf größer sind als in dem Differenz-CD-Spektrum der Bradykininteilsequenz.

Aufgrund dieser Überlegungen ist das Vorliegen des selten beobachteten 2_7-Bandes wahrscheinlich.
Im Stendomycin, so vermuten PITTNER und URRY (83,84), könnte der Lactonring durch insgesamt drei β-Turns stabilisiert sein (Abb. 58). Ohne diese Arbeit kritisieren zu wollen, sei festgestellt, daß die gleichen Ergebnisse, die das Vorliegen von β-Turns wahrscheinlich machen, auch für γ-Turns und damit für ein 2_7-Band sprechen. Anhand von ^{1}H-NMR-Messungen stellten sie nämlich fest, daß alle NH-Protonen, mit Ausnahme der beiden des Stendomycidins, in Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen. Andere Reverse Turns als β-Turns zogen PITTNER und URRY nicht in Betracht, obgleich sie feststellten, daß einer der β-Turns sterisch gehindert ist.

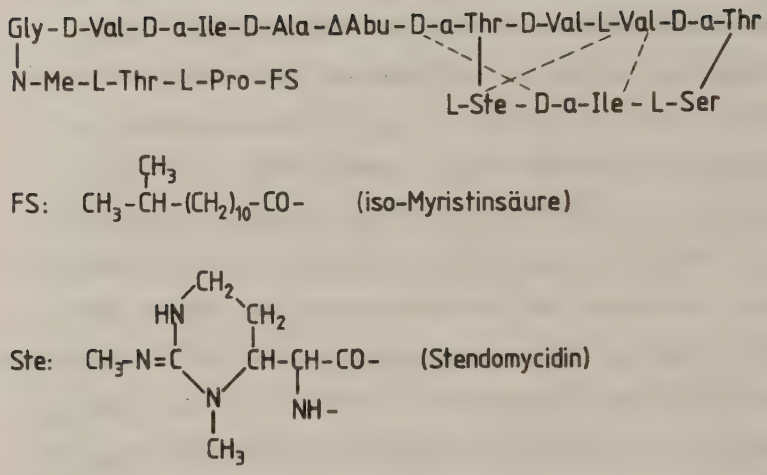


Abb. 58: Stendomycin mit schematisch eingezeichneten Wasserstoffbrückenbindungen (als β-Turns) (83)

Stendomycin enthält wie Herbicolin A keine vier Aminosäuren in Sequenz, die nicht einen Brecher* für β-Turns enthalten. Aus diesem Grunde ist für beide die Wahrscheinlichkeit gleich, durch β-Turns stabilisiert zu sein.
Die CD-Spektren von Stendomycin in verschiedenen Lösungsmitteln (84) sind nicht aussagefähig genug um eine der beiden Reverse Turns zu bestätigen oder zu widerlegen, denn diese werden vollständig von dem helikalen Teil über-

---

* Der Begriff Brecher wird im nächsten Abschnitt erläutert.

lagert. Allerdings wird bei einigen Spektren beobachtet, daß die Kurve sehr steil bei etwa 245 nm die Nullinie erreicht.

8.4. Ermittlung der Konformationsanteile im Herbicolin A

Es sind nicht immer übereinstimmende Meinungen vorhanden, welche der Modellsubstanzen für die jeweilige Konformation als Standard am besten geeignet sind. Auf die Gefahr hin, daß die Auswertung eines 2_7-CD-Spektrums an Hand von typischen β-CD-Spektren zu etwas verfälschten Werten führt, sollen trotzdem nach der einfachsten Methode die Konformationsanteile der verschiedenen Strukturtypen berechnet werden. Dabei handelt es sich um die von MYER (85) entwickelte und von ROSENKRANZ und SCHOLTAN (50) verbesserte isodichroitische Methode. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß der Gehalt an α-Helix, β-Struktur und ungeordneter Konformation unabhängig voneinander berechnet werden kann. Allerdings können aufgrund der größeren Fehlerbreite auch Prozentwerte von insgesamt über oder unter 100 % erhalten werden. Man benötigt dazu die Größe der Elliptizität bei der Wellenlänge, bei der sich die CD-Spektren der beiden anderen Konformationen schneiden (Abb. 59).

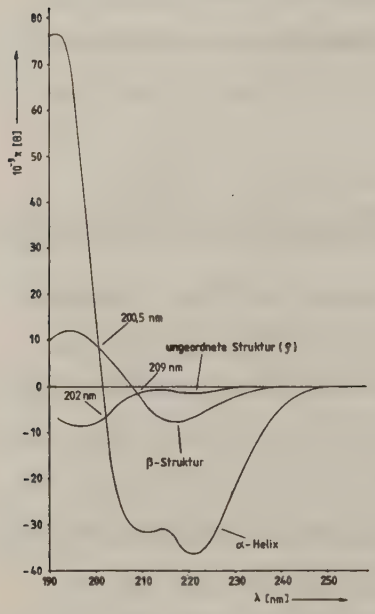


Abb. 59: CD-Spektren der Modellsubstanzen, die zur Berechnung der Konformationsanteile von Proteinen am besten geeignet sind (50). α-Helix: Poly-L-Lys in Wasser, pH 11.4; β-Struktur (antiparallel): Poly-L-Lys in 1 % SDS; ϱ-Struktur: Poly-L-Ser in 8 M LiCl

*[Grad x cm^2 x $dmol^{-1}$]

Vereinfacht wird die Methode durch Nomogramme, aus denen sich die prozentualen Anteile der verschieden Konformationen direkt ablesen lassen (Abb. 60).

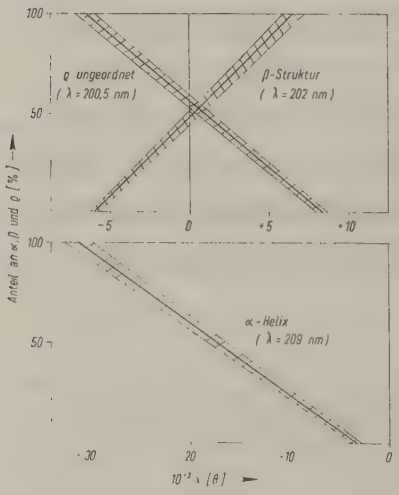


Abb. 60: Nomogramme zur Berechnung des prozentualen Anteils an α, β- und ϱ-Konformation nach der isodichroitischen Methode; CD-Spektren der Modellsubstanzen vergl. Abb. 59.

Zur Auswertung werden die Elliptizitäten bei drei verschiedenen Wellenlängen dem CD-Spektrum, entnommen (Abb. 52).

Θ_{209} = -0.37×10^3; dies entspricht 0 % α-Helix

Θ_{202} = $+8.5 \times 10^3$; dies entspricht 100 % β-Struktur

$\Theta_{200.5}$ = $+9.05 \times 10^3$; dies entspricht 0 % ϱ-Struktur

Nach der isodichroitischen Methode ist somit der β-Konformationsanteil über 100 %. Selbst wenn aufgrund der erwähnten Einschränkungen der Wert nicht genau stimmt, darf man den Schluß ziehen, daß die Carbonyl-Chromophore eine β-ähnliche Konformation einnehmen.

8.5. Konformationsvorhersage

Der Prediction Code von CHOU und FASMAN wurde aufgrund von Röntgenstrukturdaten vieler globulärer Proteine aufgestellt (86-88). Dieser ist daher streng genommen für Peptide nicht anwendbar. Trotzdem soll dieses Verfahren benutzt werden. Für die Vorhersage gelten einige empirische Regeln (vergl. dazu auch (89)). Die Aminosäuren werden dabei in verschiedene Klassen eingeteilgt (Helix-Bildner, β-Bildner, β-Brecher, usw.). Diese Begriffe werden zwar weiter verwendet, doch sollte man sich darüber im Klaren sein, daß damit Aminosäuren gemeint sind, die die

charakteristischen Winkel für die entsprechende Konformation leicht oder schwer einnehmen können.

Nach diesem Prediction Code werden für die verschiedenen Konformationen folgende Werte erhalten:

für α-Konformation

- Thr - Thr - Leu - Gly - Gln - Gly -

i_α	i_α	H_α	B_α	h_α	B_α
0.82	0.82	1.34	0.53	1.17	0.53

Als Mittelwert aus diesen 6 Aminosäuren wird P_α = 0.87 errechnet. Damit wird der Mindestwert von P_α = 1.03 nicht erreicht. Ferner enthält diese Sequenz zweimal Glycin, welches als starker Helixbrecher eingestuft ist. Es kann nicht erwartet werden, daß der Peptidteil des Herbicolin A's als α-Helix vorliegt.

für β-Konformation

- Thr - Thr - Leu - Gly - Gln - Gly -

h_β	h_β	h_β	i_β	h_β	i_β
1.20	1.20	1.22	0.81	1.23	0.81

1.13

1.08

Damit wird der geforderte Mindestwert von P_β = 1.05 überschritten. Die Sequenz enthält keinen β-Brecher. Es kann erwartet werden, daß Herbicolin A größtenteils in einer β-Konformation vorliegt.

für β-Turns

- Thr - Thr - Leu - Gly - Gln - Gly

i_{t1} h_{t2} B_{t3} H_{t4}

0.96 1.22 0.40 1.78

1.09

i_{t1} B_{t2} H_{t3} h_{t4}

0.96 0.29 2.05 1.22

1.13

b_{t1} I_{t2} B_{t3} H_{t4}

0.66 1.01 0.45 1.78

0.98

Im Herbicolin A ist keine Tetrapeptid-Teilsequenz vorhanden, die nicht mindestens einen β-Turn-Brecher enthält. Obwohl der Mindestwert von P_t = 1.06 bei zwei Teilsequenzen überschritten wird, kann nicht erwartet werden, daß im Herbicolin A ein β-Turn vorliegt.

Aufgrund der Vorhersage nach dem Prediction Code nach CHOU und FASMAN kann als einzige Sekundärstruktur nur eine β-Konformation erwartet werden. Nachdem der Prediction Code, wie schon erwähnt, im Grunde aber nur angeben kann, welche Winkel innerhalb einer Sequenz begünstigt sind, können dies auch Konformationen sein, die ähnliche

Winkelkombinationen aufweisen wie die β-Struktur. Dieses Ergebnis widerspricht in keiner Weise einer möglichen 2_7-Band-Konformation.

Nach diesen Vorhersagen und Interpretationen des CD-Spektrums ist die in Abb. 61 dargestellte Konformation wahrscheinlich. Es sei jedoch ausdrücklich angemerkt, daß Abb. 61 nur als Arbeitshypothese für weitere notwendige experimentelle Untersuchungen (insbesondere durch ^{1}H-NMR) dienen soll.

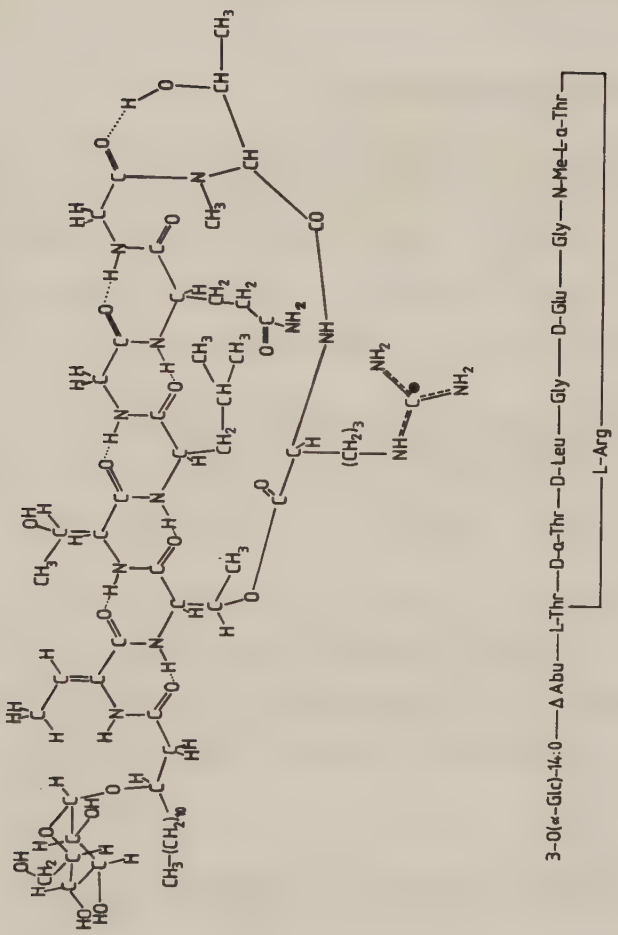


Abb. 61: Vermutete Konformation von Herbicolin A

9. DERIVATISIERUNG VON HERBICOLIN A

9.1. Katalytische Hydrierung

Die im Herbicolin A enthaltene Dehydroaminobuttersäure läßt sich katalytisch hydrieren. Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt, daß die beiden Signale bei 122.9 und 132.3 ppm verschwunden sind und statt dessen neue bei etwa 11 und 26 ppm erscheinen. Die Behandlung des ^{13}C-NMR-Spektrums erfolgte in Abschnitt 6.2.
Mit Hilfe des Massenspektrums läßt sich zeigen, daß die Masse um zwei erhöht ist (Abb. 62), so daß das Hydrierungsprodukt als Dihydro-Herbicolin A zu bezeichnen ist.

Das so hergestellte Dihydro-Herbicolin A ist beim antibiotischen Test gegen Neurospora crassa noch voll aktiv. Offensichtlich ist die Doppelbindung im Herbicolin A nicht unbedingt für die antifungische Wirkung notwendig.

9.2. Öffnung des Lactonrings zur Herbicolin A-Säure

Erwärmt man Herbicolin A in einem Gemisch aus wässriger 5 proz. $NaHCO_3$/Ethanol (1:1), so gelingt selektiv und quantitativ die Verseifung des Lactons, und man erhält das Natriumsalz der Herbicolin-A-Säure. Mittels FD-MS läßt sich zeigen, daß letztendlich NaOH addiert wurde (Abb. 63). Die Behandlung des ^{13}C-NMR-Spektrums erfolgte in Abschnitt 6.4.

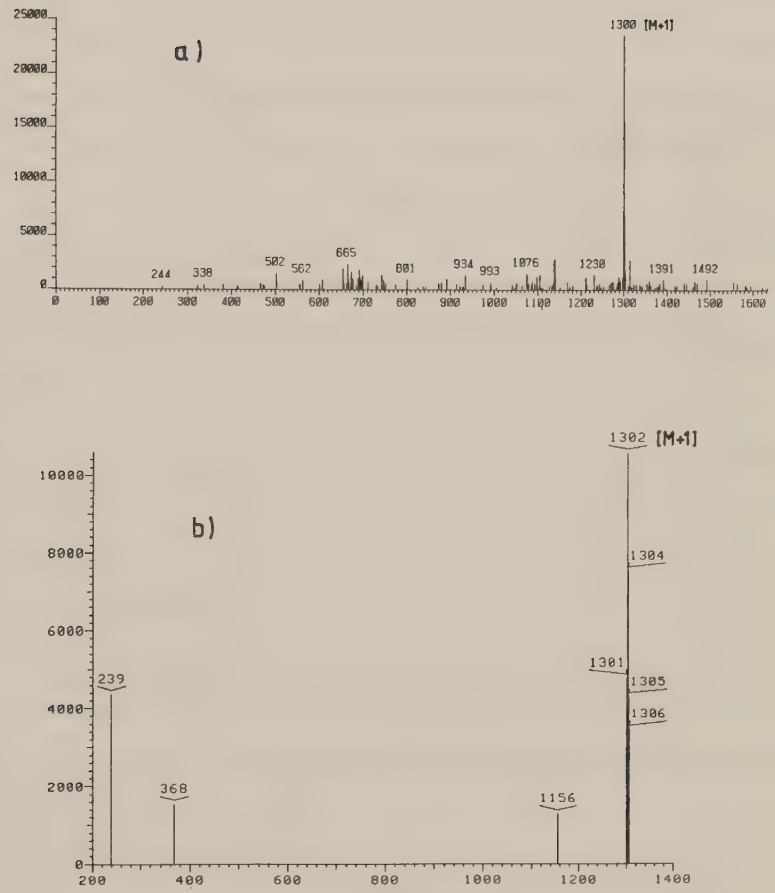


Abb. 62: FD-Massenspektren von a) Herbicolin A,
b) hydriertes Herbicolin A

Herbicolin-A-Säure besitzt keine antibiotische Aktivität mehr. Dies bedeutet, daß der Lactonring bzw. die durch ihn erreichte Konformation für die biologische Wirkung notwendig ist.

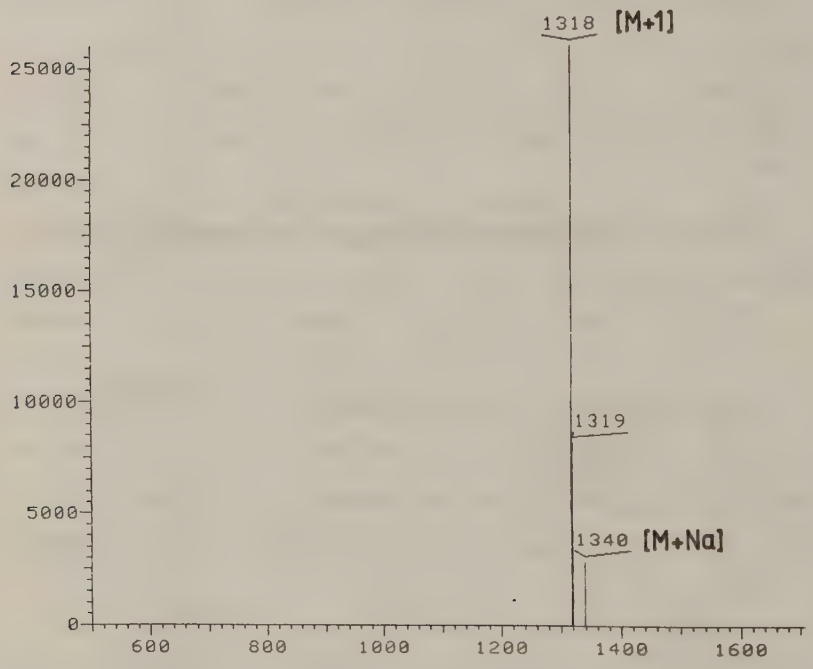


Abb. 63: FD-Massenspektrum von Herbicolin-A-Säure

9.3. Herbicolin A-Methylester

Läßt man Herbicolin A in Methanol stehen, so entsteht in ca. 2 Wochen bei Raumtemperatur daraus der Methylester. Er ist nicht mehr antibiotisch wirksam.

9.4. Dihydro-Herbicolin-A-Methylester

Bei der Hydrierung von Herbicolin A in Methanol entsteht bereits während der Reaktion der Dihydro-Herbicolin-A-Methylester. Auch Dihydro-Herbicolin A (hydriert in Aceton/H_2O) läßt sich direkt mit Methanol verestern, allerdings viel schneller als Herbicolin A selbst. ^{13}C-NMR-Spektren wurden in Abschnitt 6.3. behandelt. Auch dieses Derivat ist nicht mehr biologisch aktiv. Dihydro-Herbicolin-A-Methylester ist chromatographisch einheitlich und besitzt die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie Dihydro-Herbicolin A.

10. EXPERIMENTELLER TEIL

10.1. Materialien

Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck/Darmstadt oder Riedel de Häen/Seelze bezogen. Lösungsmittel wurden entweder p.a. käuflich erworben oder destilliert. Für die HPLC wurden nur Lösungsmittel verwendet, die extra dafür gereinigt waren: LiChrosolov (Merck) oder Chromosolv (Riedel de Haen.

Für die Dünnschichtchromatographie fanden ausschließlich DC-Platten der Firma Merck/Darmstadt mit Fluoreszenzindikator Verwendung. Für Routineuntersuchungen genügten Platten der Größe 5 x 10 cm. Zur Bestimmung der R_F-Werte dienten 5 x 20 cm große Platten mit einer Nettolaufstrecke von 10 cm. Chromatographiert wurde in frisch hergestellten Fließmittelsystemen in mit Filterpapier ausgelegten, gesättigten Kammern (Hersteller Firma Camag/Muttenz, Schweiz). Sprühmittel für Herbicolin A (Abschn. 10.4.).

Sephadex LH-20, sowie alle anderen versuchsweise eingesetzten Sephadex-Typen, wurden von der Firma Pharmacia, Servachrom XAD-2 von der Firma Serva/Heidelberg bezogen.

D,L-allo-Threonin stammte von der Firma Ferak/Berlin, D-allo-Threonin von Aldrich Chem./U.S.A., L-allo-Threonin von Calbiochem/Hoechst, 3-Hydroxymyristinsäuremethylester

von Applied Science/U.S.A. und 2-Oxo-buttersäure (Na-salz) von Merck/Darmstadt. N-Methyl-L-allo-Threonin wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W.A. König (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

10.2. Isolierung von Herbicolin A aus dem Kulturmedium von Erwinia herbicola 111*

10.2.1. Adsorptionschromatographie

Drei Tage altes Kulturmedium (20 Liter) wurde unzentrifugiert auf eine Säule (2.5 x 100 cm) mit Servachrom XAD-2 (0.3-1 mm) gegeben und mit dem zweieinhalbfachen Säulenvolumen Wasser gewaschen, um Salze, Zucker und restliche Zellen zu entfernen. (Anmerkung: Früher wurde dazwischen noch mit Aceton/Wasser (1:1) gewaschen, doch wird dabei schon ein beträchtlicher Teil des Herbicolins abgelöst, so daß schlechte Ausbeuten erreicht wurden.) Die Desorption der Herbicoline erfolgte mit Methanol. Nach etwa eineinhalb Säulenvolumen wird kein Herbicolin mehr eluiert (Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie), so daß danach alle anderen Substanzen mit Aceton von der Säule desorbiert

---

* Das Kulturmedium wurde von Herrn Prof. Dr. G. Winkelmann, Institut für Biologie I, Mikrobiologie I, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

werden können. Durch anschließendes Waschen mit etwa drei Säulenvolumen Wasser ist die Säule dann für eine nächste Trennung wieder bereit.

10.2.2. Gelchromatographie

Fraktionen, die nach dem Dünnschichtchromatogramm Herbicolin enthalten, wurden im Vakuum zur Trockene eingeengt und gesammelt. Die Rückstände von 10 Ansätzen mit jeweils 20 Liter Kulturmedium wurden in möglichst wenig Methanol (75-100 ml) aufgenommen, von geringen Mengen an schwerlöslichen Verunreinigungen abfiltriert oder abzentrifugiert und zweimal an Sephadex LH-20 (Methanol) chromatographiert (Vorsäule: 2.5 x 100 cm; Hauptsäule 5 x 100 cm). Fraktionen, die Herbicolin enthalten (dünnschichtchromatographische Kontrolle und antifungischer Test gegen Neurospora crassa) wurden eingeengt und lyophilisiert.

10.2.3. Multiplikative Gegenstromverteilung

Als geeigneste Lösungsmittelsystem für die Craig-Verteilung erwies sich Butan-2-ol/Essigsäureethylester/Wasser (1:2:1.5). Verwendet wurde eine Craig-Apparatur mit 440 Elementen mit der Bezeichnung TM 402 der Firma Labortec, Bubendorf (Schweiz). Ein Element dieses Typs faßt jeweils 10 ml Ober- und Unterphase. Das Lösungsmittelsystem wurde über Nacht äquilibriert. Auf Grund der begrenzten Löslichkeit von Herbicolin in diesem System (etwa 15 mg/ml) mußten etwa

20 Elemente mit dem in der Unterphase gelösten Lyophilisat beschickt werden. Da das System zur Emulsionsbildung neigt, dürfen vor allem zu Beginn der Trennung die Schüttelbewegungen nicht zu heftig sein (siehe Tabelle 14).

Tab. 14: Trennbedingungen an der Craig-Apparatur TM 402 für Herbicolin A

Stufenzahl	1 000 - 1 200
Schüttelbewegungen/Stufe	50
Schüttelintensität	anfangs 30
	später 50
Trennzeit	5 min

Nach etwa 1000-1200 Stufen konnte aus den Elementen 50 bis 130 reines Herbicolin A entnommen werden. Diese Fraktionen wurden zur Trockene im Vakuum eingeengt und lyophilisiert.

10.3. HPLC zur Reinheitskontrolle von Herbicolin A

Herbicolin A läßt sich durch HPLC auf seine Reinheit untersuchen. Verwendet wurde eine Doppelkolbenpumpe der Firma Waters, Modell 6000 A, ein Detektor der Firma Schöffel, Spektroflow-Monitor 770 und eine LiChrosorb-NH_2-Säule der

Firma Knauer (7 µm, 250 x 8 mm). Für eine gute Trennung eignet sich Acetonitril/0.01 M NaH_2PO_4 (75:25). Die aufgetragene Menge beträgt jeweils etwa 50 µg.

10.4. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden ausschließlich p.a.-Lösungsmittel verwendet. Bei der Firma Fluka, Buchs (Schweiz) ist das zur Herstellung des Sprühreagenzes benötigte 4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan (TDM) erhältlich. Verwendet wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck, Darmstadt. Zur Kammersättigung wurden die Dünnschichtkammern mit Filterpapier ausgelegt. Üblicherweise wurden 2 µl einer etwa 1 proz. Lösung aufgetragen.

Folgende Sprühreagenzien wurden verwendet:

a) Wasser: Nach dem Besprühen der Dünnschichtplatten mit Wasser und vorsichtigem Antrocknen mit dem Kaltluftstrom eines Föhns heben sich lipophile Substanzen deutlich als weiße Flecken vom noch feuchten, dunkleren Untergrund ab.

b) Ninhydrin: 0.5 g Ninhydrin werden in 10 ml Butan-1-ol unter Zusatz von 3 ml Eisessig gelöst (33,46).

c) TDM-Reagenz: I) 7.5 g TDM (4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan) werden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 150 Wasser verdünnt und filtriert

II) 15 g KI werden in 300 ml Wasser gelöst

Nach Mischen von I und II ist das Reagenz verwendbar und hält sich einige Wochen unzersetzt bei +5°C (90). Zum Anfärben werden die trockenen Dünnschichtplatten mit heißem Wasserdampf equilibriert, dann 5-10 min in eine mit Chlorgas gefüllte Kammer gelegt und anschließend ca. 2 min kalt geföhnt, um den größten Teil des adsorbierten Chlorgases zu entfernen. Nach dem Besprühen mit dem TDM-Reagenz erscheinen Peptide als grünblaue Flecken, deren Intensität nach einigen Minuten, besonders bei leichtem Erwärmen oder unter einer UV-Lampe, ein Maximum erreicht. Die Flecken bleiben einige Tage sichtbar, wenn die Platte dunkel aufbewahrt wird.

d) Orcin/Schwefelsäure: I) 1 g Eisen-III-chlorid werden in 100 ml 10 proz. Schwefelsäure gelöst

II) 6 g Orcin werden in 100 ml Ethanol gelöst.

10 ml I und 1 ml II werden vor Gebrauch gemischt. Nach dem Besprühen wird die Dünnschichtplatte etwa 15 min auf 110°C erhitzt.

Die Anfärbereagenzien a), b) und c) können nacheinander auf ein und derselben Platte angewandt werden, wenn diese zwischen den verschiedenen Anfärbeschritten gut getrocknet wird.

10.5. Hämolysetest

Diese Versuche wurden nach einer von H. PROBST und C. STUMPF (91) modifizierten Vorschrift (92) durchgeführt.

Pufferlösung:
Zu sämtlichen Lyse-Untersuchungen wurde ein Phosphatpuffer pH 7.0 verwendet, der wie folgt hergestellt wurde:

Lösung I: 3.58 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O + 9.0 g NaCl, auf einen Liter mit Wasser auffüllen (10 mM Na_2HPO_4, 154 mM NaCl)

Lösung II: 1.56 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O + 9.0 g NaCl, auf einen Liter mit Wasser auffüllen (10 mM Na_2HPO_4, 154 mM NaCl).

Die Lösung I und II sind isotonisch.

Zur Pufferherstellung wird Lösung II so lange zu Lösung I gegeben, bis pH 7.0 erreicht wird.

10.5.1. Einstellung der Erythrocyten-Suspension

Zu 2.5 ml einer 3.8 proz. Natriumcitratlösung wurden 2.5 ml Venenblut gegeben und anschließend bei 1000 Upm 2 min zentrifugiert, um das Plasma abzutrennen. Anschließend wurde zweimal mit je 20 ml Phosphatpuffer gewaschen. Zuletzt wurde der Rückstand in 18 ml desselben Puffers aufgenommen. Zu 0.2 ml obiger Suspension wurden 2.8 ml Phosphatpuffer gegeben und mit einigen Körnchen Digitonin vollständige Lyse herbeigeführt. Zu 1.5 ml der klaren

Lösung (zentrifugieren) wurden zunächst 0.1 ml einer 1 proz. $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung gegeben, nach 5 min 0.2 ml einer 0.1 proz. Kaliumcyanidlösung. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm gegen einen gleich behandelten Leerwert (ohne Digitonin) bestimmt. Die so ermittelte Extinktion soll bei etwa 0.5 liegen, da bei höheren Werten a) die Ablesegenauigkeit und b) eine zu Vergleichszwecken immer konstante Erythrocytenkonzentration vorliegen soll. Liegt die Extinktion über 0.5, so muß entsprechend verdünnt werden. Die so eingestellte Erythrocyten-Suspension ist bei $+4^{\circ}C$ etwa 48 Stunden haltbar, ohne daß eine Änderung im Lyseverhalten zu verzeichnen ist.

10.5.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve der Hämolyse

Aus einer alkoholischen Stammlösung (ca. 5 mg/ml) wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Um 100 % Lyse zu erreichen, wird eine 0.1 proz. Digitoninlösung angesetzt.

In einem Zentrifugenglas werden folgende Lösungen gemischt:

	alkohol. Probe	100 % Lyse 0.1 proz. Digitonin	0 % Lyse (reiner Alkohol)
alkoholische Lösung	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Puffer pH 7.0	2.7 ml	2.7 ml	2.7 ml
(10 min bei 37°C)	2.8 ml	2.8 ml	2.8 ml
Erythrocyten-Susp.	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
(1 Std. bei 37°C)	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml

Danach wird von den nicht lysierten Erythrocyten abzentrifugiert (1 min bei 1000 Upm), 1.5 ml klarer Überstand entnommen und mit 0.1 ml 1 proz. $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung und nach 5 min mit 0.2 ml 0.1 proz. KCN-Lösung versetzt. Die Extinktion des dabei gebildeten Hämiglobincyanids wird bei 546 nm gemessen (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit digitaler Anzeige).

Berechnung: $$\frac{Ext._{Probe} - Ext._{0\,\%}}{Ext._{100\,\%} - Ext._{0\,\%}} \times 100 = \%\ \text{Hämolyse}$$

10.6. Lyse von Protoplasten

Die Protoplastensuspension wurde uns freundlicherweise von Chr. Langebartels (93) (jetzt am Institut für Pflanzen-

ernäherung und Bodenkunde, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Es ist darauf zu achten, daß immer steril gearbeitet wird.

10.6.1. Herstellung der Verdünnungsreihe

20 mg Herbicolin A wurden in 1 ml Ethanol gelöst, 0, 18, 22, 26, 30 und 34 µl entnommen und mit 34, 16, 12, 8, 4 und 0 µl Ethanol gemischt. Zu jeder dieser so hergestellten Lösungen wurden 10 ml Medium PC-3 (siehe Tabelle 15) gegeben, so daß Konzentrationen von 0, 36, 44, 52, 60 und 68 µg/ml erhalten wurden.

10.6.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven

Die verwendeten Protoplastensuspensionen waren mit Medium PC-3 so eingestellt worden, daß Konzentrationen von etwa 2×10^5 Protoplasten/ml vorhanden waren.

Zu 1.5 ml der oben verdünnten Antibiotikumprobe wurden in einem kleinen Erlenmeyerkolben 1.5 ml Protoplastensuspension gegeben. Jede Probe enthielt demnach 1×10^5 Protoplasten/ml und entsprechend der obigen Verdünnungsreihe 0, 18, 22, 26, 30 bzw. 34 µg Antibiotikum/ml.

Nach 0, 18 und 24 h (bei Raumtemperatur) wurde jeweils ein Aliquot aus der gut gemischten Suspension entnommen

und die Anzahl der noch intakten Protoplasten unter dem Mikroskop ausgezählt. Um die Streubreite einzuengen wurden für jedes Antibiotikum 3 Versuchsreihen mit Dreifachbestimmungen zur Auswertung herangezogen.

Anmerkung: Da kaum ein Unterschied festzustellen war, ob nach 18 oder 24 h ausgezählt wird, ist bei zukünftigen Versuchen zu untersuchen, ob die Lysezeit nicht verkürzt werden kann, da dann die Zellmembran noch nicht durch die sich ausbildende Zellwand stabilisiert ist.

Um die Streubreite eines derartigen Lyseversuchs zu demonstrieren, sind in Tabelle 16 die Werte einer solchen Meßreihe wiedergegeben.

Tab. 15: Zusammensetzung des Mediums PC-3 zur Protoplastenkultur und Lyse

Mineralsalze	Konzentration [mM]
NH_4NO_3	20.6
KNO_3	18.8
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	4.5
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1.5
KH_2PO_4	1.25
Spurenelemente	**[µM]**
H_3BO_3	100
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	100
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	30

Fortsetzung der Tabelle 15

KI	5.0
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	1.0
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0.1
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	0.1
Na_2EDTA	20
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	20
Zucker(alkohole)	[mM]
Saccharose	43.8
Mannit	250
Sorbit	250
Vitamine	[mg/l]
m-Inosit	100
Nicotinsäure	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Pyridoxin-HCl	0.5
Hormone	[mg/l]
α-Naphthylessigsäure	0.6
Benzylaminopurin	0.1
Aminosäuren	[mg/l]
L-Alanin	29.7
L-Aminobuttersäure	26.0
L-Arginin-HCl	3.1
L-Asparagin	3.8
L-Asparaginsäure	1.7
L-Glutamin	0.3
L-Glutaminsäure	15.7

Fortsetzung der Tabelle 15

Glycin	2.7
L-Histidin	0.05
L-Leucin	5.0
L-Lysin-HCl	2.0
DL-Methionin	0.05
DL-Phenylalanin	0.05
L-Prolin	1.9
L-Serin	12.8
DL-Threonin	4.1
L-Tyrosin	0.05
DL-Valin	2.3

pH wird auf 5.6 eingestellt

Tab. 16: Lyse an Protoplasten durch Herbicolin A (ausgezählte Protoplasten((eine der 3 Meßreihen)

Zeit [h]	Probe	Konzentration [µg/ml] 0	10	20	30	50
	1	84	66	114	74	64
0	2	73	59	108	92	72
	3	42	38	35	46	33
	1	89	73	81	43	70*
18	2	77	68	65	61	105*
	3	44	(10)	24	37	32*
	1	76	67	93	25	35*
24	2	63	46	60	45	44*
	3	30	23	54*	19	20*
		noch vorhandene Protoplasten in %				
	1		104	67	55	52
18	2		111	58	64	69
	3		(25)	65	77	46
	1		112	90	37	30
24	2		90	64	57	36
	3		85	108	58	42
		gemittelte Werte einer Meßreihe in %				
18			108	63	65	56
24			96	87	51	36

* Anmerkung: Waren auf der Auszählplatte unter dem Mikroskop die Protoplasten ungleichmäßig verteilt, oder relativ

Fortsetzung der Anmerkung zu Tabelle 16

wenige vorhanden, so daß der Fehler groß werden könnte, so wurde bei den so bezeichneten Messungen die doppelte Fläche ausgezählt. Diese Werte müssen durch 2 dividiert werden.

10.7. Entkopplung der Photosynthese bei Chloroplasten

10.7.1. Isolierung der Chloroplasten

Radieschenkeimblätter (6 bis 7 Tage alt) werden in einem Mixer ca. 10 sec mit Isolierpuffer (Tabelle 17) homogenisiert, durch 16 Lagen Mull filtriert und das Filtrat 1 min (+4°C) bei 8000 g abzentrifugiert. Sediment in Isolierpuffer aufnehmen und nochmals 5 min, 4°C bei 200 g zentrifugiert. Sediment verwefen, Überstand 10 min, 4°C bei 1000 g zentrifugieren. Sediment in ca. 2 ml Meßpuffer (Tabelle 18) aufnehmen (ca. 2 mg/ml) und im Eisbad bis zur Messung aufbewahren.

10.7.2. Durchführung der Messung

Die polarographische Messung der Sauerstoffkonzentration wurde in einer temperierbaren Plexiglasküvette (Inhalt maximal 5 ml) durchgeführt, welche eine Platin/Silber-Elektrode nach Clark enthält. Die Küvette mit Inhalt wurde

vor jeder Messung auf 20°C temperiert und ist an einen Linienschreiber angeschlossen. Belichtet wurde mit einem handelsüblichen Diaprojektor.

Zu dem mit N_2 begasten Meßpuffer (damit möglichst aller Sauerstoff verdrängt ist) wird so viel Chloroplastensuspension zugegeben, daß eine Endkonzentration von 35 µg Chlorophyll/ml erreicht wird. Als Elektronenakzeptor wird $K_3[Fe(CN)_6]$ zugemischt (1 mM Endkonzentration). Nach 2 min Dunkeladaption wird eine Minute belichtet. Die hierbei gebildete Sauerstoffmenge ist proportional der Steigung. Wird, nachdem ein Entkoppler (Antibiotikum) zugegeben wurde, wieder belichtet, so beobachtet man eine höhere Sauerstoffrate (größere Steigung). Durch Vergleich der Steigungen läßt sich die Steigerungsrate als Maß für die Entkopplung bestimmen.

Tab. 17: Zusammensetzung der Isolierpuffer

	[mM]	g/1 l
Saccharose	400	136.9
Hepes	50	11.9
NaCl	10	0.55
$MgCl_2$	1	0.2
KNO_3	2	0.2
$K_2HPO_4 x\ 3H_2O$	1	0.23
EDTA	4	1.5
iso-Ascorbinsäure		0.75
Rinder-Serumalbumin		0.5

mit ca. 10 N KOH auf pH 7.8-8.0 eingestellt

Tab. 18: Zusammensetzung des Meßpuffers

Tricin	30 mM	8.35 g/2 l
Saccharose	200 mM	137 g/2 l
NaCl	20 mM	2.34 g/2 l
$MgCl_2$	3 mM	1.22 g/2 l

mit ca. 10 N KOH auf pH 7.6 eingestellt

10.8. Aminosäurenanalyse*

Etwa 100 nMol Peptid wurden in etwa 500 µl 6 N HCl gelöst und 18 h bei 110°C in einer zugeschmolzenen Glasampulle hydrolsiert. Nach dem Eindampfen unter Verwendung eines Rotationsverdampfers wurde der Rückstand in 1 ml Natriumcitratpuffer pH 2.2 gelöst und 100 µl davon zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in den automatischen BIOTRONIC AMINOSÄUREANALYSATOR LC 6000 E eingespritzt.

10.9. Katalytische Hydrierung von Herbicolin A

200 mg Herbicolin A werden in 10 ml Methanol (oder falls Veresterung vermieden werden soll in Aceton/Wasser (2:1)), gelöst und mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt. Nachdem

* Für diese Analysen danke ich Frau M. Munari, Tübingen

mit Stickstoff der gelöste Sauerstoff verdrängt wurde, läßt man langsam Wasserstoff durch die Suspension perlen. Zur Kontrolle wurde in Abständen von jeweils 1 h die Umsetzung dünnschichtchromatographisch beobachtet. Je nach Aktivität des Katalysators konnte die Hydrierung unter Umständen schon nach 3 h abgebrochen werden. Dazu wurde vom Katalysator abfiltriert, eingeengt und lyophilisiert.

10.10. Konfigurationsbestimmung

Die durch Totalhydrolyse (siehe Abschn. 10.8.) erhaltenen Aminosäuren wurden mittels 20 % Acetylchlorid in n-Propanol (30 min/150°C) verestert mit N_2 zur Trockene abgeblasen und in 250 µl CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 50 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid acyliert (15 min/130°C). Durch anschließende Gaschromatographie an einer Chirasil-Val-Säule (94,95) lassen sich enantiomere Aminosäuren trennen und identifizieren. Zusätzlich wurde jeder GC-Peak massenspektrometrisch untersucht.

Daten für GC:
Gaschromatograph: Carlo-Erba, Modell 2101
Trägergas: Wasserstoff, 0.4 atm
Detektor: FID
Probenmenge: 1 µl
Temperaturprogramm: 2 min 87°C, dann 4°/min bis 200°C
Säule: Chirasil-Val, Kapillarsäule, 25 m

Daten für GC/MS: Gaschromatograph: Carlo-Erba, Modell 2900
Massenspektrometer: MAT 112 S
Kopplung: offen
sonstige Daten wie oben

10.11. HPLC-Trennungen

Zur Verfügung standen zwei Doppelpumpen Modell 6000 A, eine Probenaufgabeeinheit U6K und ein Gradientenprogrammer Modell 660 (alle von der Firma Waters). Zur Detektion diente ein Spektroflow-Monitor 770 (variable Wellenlänge) der Firma Schöffel (Vertrieb durch Firma Kratos).

Es wurden nur solche Lösungsmittel verwendet, die als solche von den Herstellern extra für die HPLC empfohlen werden (LiChrosolv von der Firma Merck/Darmstadt oder Chromosolv von der Firma Riedel de Häen/Seelze).

10.12. NMR-Spektren*

Zur Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren wurden Lösungen mit 200-400 mg/ml verwendet. Für ^{1}H-NMR-Spektren genügten

---

* Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Herrn Dipl.-Chem. H. Kolshorn und Herrn R. Bretthauer, Tübingen.

Konzentrationen von etwa 10 mg/ml. Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker WH-400 Spektrometer (400.13 MHz) bei 25°C aufgenommen. An diesem Gerät wurden auch die ^{1}H-breitbandentkoppelten ^{13}C-NMR-Spektren (100.6 MHz) erhalten.

10.13. Massenspektren*

Die Massenspektren wurden an einem Massenspektrometer MAT 711 (Varian, Bremen) aufgenommen, das mit dem Datensystem SS 200 gekoppelt ist. Die Ionenquellentemperatur betrug bei den FD-Massenspektren 64°C und bei den EI-Massenspektren (70 eV, Direkteinlaß) 200°C.

10.14. CD-Spektren

Das CD-Spektrum wurde sowohl an einem JASCO-J-20A Spektrographen als auch zur Kontrolle an einem Roussel Jouan Dichrograph CD 185 bei 25°C aufgenommen. Beide Geräte lieferten gleiche Spektren in dem untersuchten Bereich (200-270 nm).

---

* Für die Aufnahme der Massenspektren danke ich Herrn Dipl.-Ing (FH) H. Bartholomä, Tübingen.

10.15. Acidolytische Spaltung

1 mg Herbicolin A werden in 1 ml Methanol gelöst, 200 µl konz. HCl zugesetzt und eine Stunde lang auf 90°C erwärmt. Danach wurde die Lösung im Vakuum zur Trockene eingeengt und die Bruchstücke dünnschichtchromatographisch im System I getrennt (vergl. Abschn. 5.1.).

10.16. Ammoniakalische Spaltung

Etwa 10 mg Herbicolin A wurden in 5 ml konz. Ammoniaklösung suspendiert und über Nacht stehen gelassen. Danach wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt und das Gemisch durch multiplikative Gegenstromverteilung (Craig-Apparatur der Firma Labortec, Bubendorf/Schweiz) getrennt. Die Apparatur besitzt 280 Elemente. Jedes Element faßt je 2 ml Ober- und Unterphase. Verwendet wurde hierbei das Lösungsmittelsystem Butan-2-ol/Essigsäureethylester/Wasser (1:2:1).

Trennbedingungen:	135 Stufen
Schüttelbewegungen/Stufe	50
Schüttelintensität	50
Trennzeit	5 min

Die in den Elementen 6-15 vorhandene dünnschichtchromatographisch reine Hauptkomponente wurde gesammelt, im Vakuum zur Trockene eingeengt und zur Sequenzierung weiter verwendet. Ausbeute: ca. 3 mg.

10.17. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid

50 µl des zu untersuchenden Peptids (ca. 0.5 mM in 50 mM $NaHCO_3$-Puffer, pH 10.0) wurden mit 150 µl einer frisch hergestellten Dansylchloridlösung (ca. 2.7 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Analog derivatisiert man Aminosäuren, die dann direkt zur Chromatographie eingesetzt werden können. Das Peptidderivat wird dann am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und mit etwa 100 µl 6 N HCl 18 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Nach dem Einengen zur Trockene wurde das Hydrolysat in 200 µl Aceton/Wasser (3:1) gelöst und davon 0.1 bis 0.5 µl (sehr feine Glaskapillare) in der rechten unteren Ecke der Polyamidfolien aufgetragen. Die parallel dazu derivatisierten Aminosäuren wurden an gleicher Stelle auf der Rückseite aufgetragen. Die hierbei verwendeten Wang-Folien haben den Vorteil, daß die unter UV-Licht fluoreszierenden Substanzflecken auch durch die durchsichtige Trägerfolie sichtbar sind, so daß eine leichtere und sichere Zuordnung möglich ist. Diese Polyamid-Folien (Wang-Folien) sind von der Firma Macherey und Nagel bezogen und auf 5 x 5 cm zugeschnitten worden. Bewährt haben sich für die zweidimensionale Trennung die Systeme A) Ameisensäure/Wasser (4:96) und B) Essigsäure/Toluol (2:8) jeweils v/v, vergl. dazu auch (27,46).

10.18. Edman-Abbau

1.5 mg des zu untersuchenden Peptids (Abschnitt 10.16.) wurden in 50 µl Methanol gelöst, mit 200 µl Wasser verdünnt und mit 750 µl Phenylisothiocyanat in Pyridin (50 mg/ml) versetzt. Nach Verschließen der Ampulle wurde 90 min lang auf 50°C erwärmt. Nach dem Einengen im Vakuum bis zur Trockene wurden 500 µl Trifluoressigsäure zugesetzt und 30 min bei 50°C belassen. Nach dem Abziehen der Trifluoressigsäure wurde der Rückstand in 1 ml Wasser aufgenommen und viermal mit Essigsäureethylester extrahiert. Sowohl die vereinigten organischen Extrakte als auch die wässrige Phase wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Da bekannt ist, daß PTH-Arg nicht extrahierbar war (46), konnte es nicht verwundern, dieses in der wässrigen Phase zu finden. Um das Restpeptid von der abgespaltenen Aminosäure abzutrennen, wurde die Gelchromatographie herangezogen. Verwendet wurde dazu eine Säule (0.5 x 50 cm) mit Sephadex LH-20 in Methanol. Das kaum retardierte Restpeptid zeigte nach Einengen der entsprechenden Fraktionen, daß es keinem weiteren Edman-Abbau zugänglich ist, da es keine freie Aminofunktion mehr besitzt. Mit einer neuen Probe wurde der Abbau wiederholt, wobei dieser Befund bestätigt wurde.

10.19. Herbicolin-A-säure

150 mg Herbicolin A wurden in 500 µl Ethanol gelöst mit 500 µl 5 proz. $NaHCO_3$-Lösung versetzt und 3 h auf 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde mit 1 N Essigsäure neutralisiert und zur Trockene eingeengt, der Rückstand in Methanol gelöst und an einer Sephadex LH-20-Säule (1 x 50 cm) chromatographiert. Die das Hauptprodukt enthaltenden sauberen Fraktionen wurden eingeengt und lyophilisiert. Ausbeute 138 mg.

10.20. Herbicolin-A-methylester

150 mg Herbicolin A wurden in 1 ml Methanol gelöst und zwei Wochen bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei sich der Methylester fast quantitativ bildet.

10.21. Dihydro-Herbicolin-A-methylester

Läßt man 200 mg Dihydroherbicolin A in 1 ml Methanol über Nacht bei Raumtemperatur stehen, so bildet sich fast quantitativ daraus der Methylester.

11. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein einfaches Reinigungsverfahren für Herbicolin A ausgearbeitet (Adsorptionschromatographie an Servachrom XAD-2, Gelchromatographie an Sephadex LH-20 und Multiplikative Gegenstromverteilung). Dabei mußte die Empfindlichkeit von Herbicolin A gegen acide, basische und nucleophile Reagenzien berücksichtigt werden.

Die Primärstruktur wurde mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie ermittelt. Danach besteht Herbicolin A aus einem Peptidteil mit der Sequenz Deh-Abu-L-Thr-D-a-Thr-D-Leu-Gly-D-Glu-Gly-N-Me-L-a-Thr-L-Arg. Die Carboxygruppe des Arginin bildet mit der Hydroxyfunktion des L-Threonin ein Lacton. N-Terminal ist dieses Peptid durch 3-Hydroxymyristinsäure acyliert, an welche α-glycosidisch Glucose gebunden ist.

Durch Vergleich des CD-Spektrums von Herbicolin A mit den Spektren verschiedener Standards kann angenommen werden, daß im Herbicolin A das selten beobachtete 2_7-Band vorliegt.

Die antifungischen Wirkungsweisen von Herbicolin A und Polyenantibiotika sind sehr ähnlich (Membransteroide müssen vorhanden sein). Die Doppelbindung der Dehydroaminobuttersäure kann katalytisch hydriert werden, ohne daß dadurch die antibiotische Aktivität gegen Pilze verloren geht.

Herbicolin A besitzt hämolytische Eigenschaften. Es bildet keine Ionenkanäle aus; an Protoplasten und Chloroplasten

sind geringe oder keine Effekte bezüglich einer Permeabilitätsänderung zu erkennen. Bei Paramecien wird durch Zugabe von Herbicolin A eine Steigerung der Guanylatcyclase-Aktivität beobachtet. An B-Lymphocyten konnte kein mitogener Effekt nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen werden diese lysiert.

12. LITERATUR

(1) A. v. Graevenitz und M.E. Cooper-Smith, Microbiol. 1, 29-32 (1978)

(2) R. Lupp, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1979)

(3) M. Chaput, G. Michel und E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta 63, 310-326 (1962)

(4) P. Jolles, F. Bigler, T. Gendre und E. Lederer, Bull. Soc. chim. biol. 43, 177-192 (1961)

(5) M. Chaput, G. Michel und E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta 78, 329-341 (1963)

(6) G. Winkelmann, R. Lupp und G. Jung, J. Antibiot. 33, 353-358 (1980)

(7) G. Winkelmann, Chr. Glück, R. Lupp und G. Jung, in Structure and Activity of Natural Peptides, Selected topics. Proceedings of the Fall Meeting of Gesellschaft für Biologische Chemie, held at Tübingen, Germany, Sept. 1979 (W. Voelter und G. Weitzel, eds.), Walter De Gruyter Verlag, Berlin-New York

(8) G. Winkelmann und W. Adam, Mykosen 23, 290-294 (1980)

(9) T.-J. Franklin und G.A. Snow: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1973)

(10) W. Raab und F. Högl, Mykosen 24, 525-533 (1981)

(11) E.A. Freundt und G. Winkelmann, in Vorbereitung

(12) Chr. Glück, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1978)

(13) H. Brückner, Dissertation, Universität Tübingen (1979) G. Jung, H. Brückner, R. Oekonomopulos, G. Boheim, E. Breitmaier und W.A. König, in Peptides: Structure and Biological Functions, Proceedings of the 6th American Peptide Symposium (E. Gross und J. Meienhofer, eds.) 647-654 (1979)

(14) G. Irmscher und G. Jung, Europ. J. Biochem. 80, 165-174 (1977)

(15) G. Richter: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

(16) H. Lichtenthaler und K. Pfister: Praktikum der Photosynthese, Verlag Quelle & Meyer, Heidelberg (1978)

(17) H. Metzner: Pflanzenphysiologische Versuche, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York (1982)

(18) G. Boheim und H.A. Kolb, J. Membrane Biol. 38, 99-150 (1978)

(19) G. Boheim, K. Janko, D. Leibfritz, T. Ooka, W.A. König und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 433, 182-199 (1976)

(20) G. Boheim, G. Irmscher und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 507, 485-506 (1978)

(21) P. Mueller und D.O. Rudin, Nature 217, 713-719 (1968)

(22) R. Tieman, D. DiFiore und H.T. Witt, Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Biophysik, (G. Adam und G. Stark, eds.) Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, Seite 70 (1979)

(23) H.-L. Huber und B. Rumberg, dito, Seite 74

(24) K.H. Wiesmüller, W. Bessler und G. Jung, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 593-606 (1983)
R.B. Johnson, S. Köhl, K.H. Wiesmüller, G. Jung und W.G. Bessler, Immunobiol. 165, 27-35 (1983)

(25) O. Lüderitz, C. Galanos, V. Lehmann, H. Mayer, E.Th. Rietschel und J. Weckesser, Naturwiss. 65, 578-585 (1978)

(26) S. Klumpp, G. Jung und J.E. Schultz, Europ. J. Biochem., im Druck

(27) H. Laatsch, J. Chromatogr. 173, 398-402 (1979)

(28) Proteine Sequence Determination, Bd. 8, aus der Reihe Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, edited by S.B. Needleman, 2nd Edition, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, Seite 42 (1975)

(29) U. Schmidt, J. Häusler, E. Öhler und H. Poisel, in Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 37, 251-327, Springer Verlag, Wien-New York (1979)

(30) H. Iwasaki, S. Horii, M. Asai, K. Mizuno, J. Ueyanag und A. Miyake, Chem. Pharm. Bull. 21, 1184-1191 (1973)

(31) W.A. König, J. HRC & CC, 588-595 (1982)

(32) J. Benecke und W.A. König, Angew. Chem. 94, 709-710 (1982)

(33) E. Stahl: Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2. Auflage (1967)

(34) M. Aydin, Dissertation, Universität Hamburg (1983)

(35) E. Breitmaier und W. Voelter: ^{13}C-NMR Spektroskopy, Verlag Chemie (1974)

(36) K. Bock und C. Pedersen, J. Chem. Soc. Perkin II 1, 293-297 (1974)

(37) K. Tori, K. Tokura, K. Okabe, M. Ebata und H. Otsuka, Tetrah. Lett. 1, 185-188 (1976)

(38) B.W. Bycroft und M.S. Gowland, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1, 256-258 (1978)

(39) R. Traber, H.-R. Loosli, H. Hofmann, M. Kuhn und A. von Wartburg, Helv. Chim. Acta 65, 1655-1677 (1982)

(40) K. Wüthrich, G. Jung und H. Brückner, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 275-289 (1981)

(41) K. Wüthrich, G. Jung und H. Brückner, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 291-304 (1981)

(42) R. Deslauriers, P. Tanerède, W.H. McGregor, D. Sarantakis, R.L. Somorjai und C.P. Smith, in Nuclear Magnetic Resonance Spektroscopy in Molecular Biology, Vol. 11, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht/Holland-Boston/USA-London/England (1978)

(43) K. Wüthrich, in NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam (1976)

(44) N.G. Kumar und D.W. Urry, Biochem. 12, 3811-3817 (1973)

(45) R.U. Lemieux und J.D. Stevens, Canad. J. Chem. 44, 249-262 (1966)

(46) G. Pataki: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Verlag De Gruyter & Co., Berlin (1966)

(47) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1969, Biochem. 9, 3471-3479 (1970)

(48) G.N. Ramachandran und Sasizekharan, Adv. Protein Chem. 23, 283-438 (1968)

(49) E. Breitmaier und G. Jung: Organische Chemie II, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York (1983)

(50) H. Rosenkranz und W. Scholtan, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 896-904 (1971)

(51) G.E. Schulz und R.H. Schirmer: Principles of Protein Structure, Charles R. Cantor (Ed.), Springer Verlag New York-Heidelberg-Berlin (1979)

(52) J.A. Smith und L.G. Pease, CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 315-399 (1980)

(53) C. Toniolo, CRC Crit. Rev. Biochem. 9, 1-43 (1980)

(54) B.W. Mathews, Macromol. 5, 818-819 (1972)

(55) J. Smolikova, A. Vitek und K. Blaha, Coll. Czech. Chem. Commun. 36, 2474-2485 (1971)

(56) J.R. Cann, Biochem. 11, 2654-2659 (1972)

(57) P. Anagnostaras, P. Cortopatis, J. Matsoukas, G. Stavropulos und D. Theodoropulos, Tetrahedron 34, 973-975 (1978)

(58) S.-J. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, T. Sugita, E. Kato und E. Kondo, J. Amer. Chem. Soc. 73, 1330-1333 (1951)
S.-J. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi und R. Souda, J. Amer. Chem. Soc. 74, 270-271 (1952)
S.-J. Mizushima, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, K. Kuratani, T. Sugita, N. Mataga und R. Souda, J. Amer. Chem. Soc. 75, 1863-1865 (1953)
S.-J. Mizushima, M. Tsuboi, T. Shimanouchi, T. Sugita und T. Yoshimoto, J. Amer. Chem. Soc. 76, 2479-2482 (1954)
S.-J. Mizushima, M. Tsuboi, T. Shimanouchi und M. Asai, J. Amer. Chem. Soc. 76, 6003-6006 (1954)
M. Tsuboi, T. Shimanouchi und S.-J. Mizushima, J. Amer. Chem. Soc. 81, 1406-1411 (1959)

(59) G. Crippen und J.T. Yang, J. Phys. Chem. 78, 1127-1130 (1974)

(60) M. Branik und H. Kessler, Chem. Ber. 10, 2176-2188 (1975)

(61) J.R. Cann, J.M. Stewart und G.R. Matsueda, Biochem. 12, 3780-3788 (1973)

(62) E.E. Barnes und W.T. Simpson, J. Chem. Phys. 39, 670-675 (1963)

(63) A.N. Glazer und K. Rosenheck, J. Biol. Chem. 237, 3674-3678 (1962)

(64) C. Cohen, Nature 175, 129-130 (1955)

(65) N. Greenfield und G.D. Fasman, Biochem. 8, 4108-4116 (1969)

(66) L.K. Li und A. Spector, J. Amer. Chem. Soc. 91, 220-222 (1969)

(67) F. Quadrifoglio und D.W. Urry, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2760-2765 (1968)

(68) G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, Europ. J. Biochem. 54, 395-409 (1975)

(69) T. Butters, P. Hütter, G. Jung, N. Pauls, H. Schmitt, G.M. Sheldrick und W. Winter, Angew. Chem. 93, 904-905 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 889-890 (1981)

(70) N. Greenfield, B. Davidson und G.D. Fasman, Biochem. 6, 1630-1637 (1967)

(71) S. Bychok, Ann. Rev. Biochem. 37, 437-462 (1968)

(72) S.N. Timasheff, H. Susi, R. Townend, L. Stevens, M.J. Gerbunoff und T.F. Kumosinski, in G.N. Ramachandran: Conformation of Biopolymers, Vol. I, Seite 173 ff, Acad. Press, New York (1967)

(73) R. Townend, T.F. Kumosinski, S.N. Timasheff, G.D. Fasman und B. Davidson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 163-169 (1966)

(74) P.K. Sarkar und P. Doty, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 981 (1966)

(75) F. Quadrifoglio und D.W. Urry, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2760-2765 (1968)

(76) W.B. Gratzer und D.A. Cowburn, Nature 222, 426-431 (1969)

(77) R.W. Woody, in Peptides, Polypeptides and Proteins, E.R. Blout, F.A. Bovey, M. Goodman and N. Lotan (Eds.), Seite 338-350, J. Wiley &Sons, New York (1974)

(78) S. Brahms, J. Brahms, G. Spach und A. Brack, Proc. nat. Acad. Sci. USA 74, 3208-3212 (1977)

(79) M. Kawai und G. Fasman, J. Amer. Chem. Soc. 100, 3630-3632 (1978)

(80) L. Stevens, R. Townend, S.N. Timasheff, G.D. Fasman und J. Potter, Biochem. 7, 3717-3720 (1968)

(81) G.D. Fasman und J. Potter, Bichem. Biophys. Res. Commun. 27, 209-216 (1967)

(82) S. Ikeda, A. Fukutome, T. Imae und T. Yoshida, Biopolymers 18, 335-349 (1974)

(83) T.P. Pitner und D.W. Urry, Biochem. 11, 4132-4137 (1972)

(84) D.W. Urry und A. Ruiter, Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 800-806 (1970)

(85) Y.P. Myer, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1, 607 (1970)

(86) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Biochem. 13, 211-222 (1974)

(87) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Biochem. 13, 222-245 (1974)

(88) P.Y. Chou und G.D. Fasman, J. Mol. Biol. 115, 135-175 (1977)

(89) H. Mutter, Dissertation, Universität Tübingen (1978)

(90) E. v. Arx, M. Faupel und M. Brugger, J. Chromatogr. 120, 224-228 (1976)

(91) C. Stumpf, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1973)

(92) E. Pouder: Hemolysis and Related Phenomena, Verlag Grune and Stratton, New York (1948)

(93) Chr. Langebartels, Dissertation, Universität Tübingen (1981)

(94) E. Gil-Av, B. Feibush und R. Charles-Sigler, in A.B. Littlewood (Ed.), Gaschromatography, Institute of Petrol, London, Seite 227 ff (1966)

(95) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174-176 (1977)

LEBENSLAUF

Rudolf Lupp

3.12.1943	geboren in Breslau, der Eheleute Friedrich und Anneliese Lupp (geb. Kowalczyk)
1950 bis 1957	Volksschule in Memmingen
1957 bis 1960	kaufmännische Mittelschule in Memmingen
1960 bis 1961	Praktikum bei der Firma Joh. Pfeffer in Memmingen
1961 bis 1963	Ausbildung zum Chemisch-technischen Assistenten am Technikum für Chemie und Physik in Isny
1963 bis 1965	berufstätig bei der Firma Boehringer u. Soehne GmbH Mannheim, Werk Tutzing
1965 bis 1967	Ausbildung zum Chemie-Ingenieur (grad.), jetzige Bezeichnung Dipl.Ing. (F.H.), am Technikum für Chemie und Physik in Isny
1967 bis 1968	berufstätig bei der Firma Boehringer u. Soehne GmbH Mannheim, Werk Tutzing
1969 bis 1971	berufstätig bei der Firma Reinz Dichtungen GmbH in Neu-Ulm
seit 4.7.1969	verheiratet mit meiner Frau Gertrud (geb. Miller)
1971 bis 1979	Chemiestudium an der Universität Tübingen mit Diplomexamen am 25.3.1979. Experimentelle Diplomarbeit von Juli 1978 bis März 1979 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Jung
1979 bis 1983	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit "Isolierung, Struktur und Eigenschaften des Antibiotikums Herbicolin A" unter Leitung von Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
11.6.1981	Geburt unserer Tochter Bettina
13.4.1983	Geburt unseres Sohnes Wolfgang

Meine akademischen Lehrer waren Frau Prof. Dr. S. Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, F.F. Seelig, J. Strähle, W. Voelter, W. Zeil.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45